UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
DEC '56

EXPERIENTIA

EST EXPERIENTIA SCIENTIA PARACELSUS

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER (Basel) · R. MATTHEY (Lausanne) · A. v. MURALT (Bern) · L. RUZICKA (Zürich)
Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE – SCHWEIZ – SVIZZERA – SWITZERLAND

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

A. Bückmann: Marine Fischereibiologie und allgemeine Meeresbiologie 405
E. Gäumann: Über Abwehrreaktionen bei Pflanzenkrankheiten 411

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

G. Bergerhoff, H. Koyama und W. Nowacki: Zur Kristallstruktur der Mineralien der Chabasit- und der Faujasitgruppe 418
Ch. J. Morel: Über 1-Halogenderivate des D-Glucosamins 419
E. Kellenberger et A. Ryter: Fixation et inclusion du matériel nucléaire de *Escherichia coli* 420
E. Kellenberger, W. Schwab et A. Ryter: L'utilisation d'un copolymère du groupe des polyesters comme matériel d'inclusion en ultramicrotomie 421
R. M. S. Smellie and J. N. Davidson: The Incorporation of Carbon Labelled Precursors into the Nucleic Acids of Various Tissues in the Intact Rabbit 422
R. M. Hardisty, G. I. C. Ingram, and R. S. Stacey: Reserpine and Human Platelet 5-Hydroxytryptamine . . . 424
S. Lagerstedt: The Release of Ribonucleic Acid from Carnoy Fixed Sections During Incubation in McIlvaine's Buffer 425
M. Oka, O. Wasz-Höckert, and O. Widholm: 17-Hydroxycorticosteroids in Human Milk 426
D. H. Ingvar and U. Söderberg: The Effect of LSD-25 upon the Cerebral Blood Flow and EEG in Cats 427
B. E. Volcani and S. Sarid: Relationship Between Methionine and Aromatic Amino Acids in *Escherichia Coli* . . 429
P. Bálint and I. Forgács: The Apparent Expansion of the Inulin Space in the Nephrectomized Dog 431
M. Boccacci and S. Bettini: Co-enzyme A Content in the American Cockroach (*Periplaneta americana* L.) and the Housefly (*Musca domestica* L.) 432
G. Grupp und F. C. Roulet: Über den Einfluss von Organextrakten auf den Sauerstoffverbrauch von Geweben 433
J. Jacob et M. Dechavassine: Inhibition sélective des «vraies» et «pseudo»-cholinestérases du rectus de grenouille 434
B. Silvestrini and V. G. Longo: Selective Activity of Morphine on the 'EEG Arousal Reaction' to Painful Stimuli 436
G. E. Gruenfeld: Spontaneous Anastomosis Between Surgically Closed Intestinal Loops 437
B. Rybak et J. Retail: Persistance d'un train d'ondes électriques ternaire dans toute entité fonctionnelle isolée du cœur de *Rana esculenta* 438
H. Esch: Die Elemente der Entfernungsmitteilung im Tanz der Bienen (*Apis melifica*) 439
St. Szára: Dimethyltryptamin: Its Metabolism in Man; the Relation of its Psychotic Effect to the Serotonin Metabolism 441
G. Zbinden und A. Studer: Wirkung der Glutaminsäure auf die experimentelle Isoniazid-Schädigung peripherer Nerven bei Ratten (Disputandum) 442
C. J. M. Rondle and B. J. Carman: Agar Diffusion Plates: The Recording of Experimental Data (Pro experimentis) 443

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

H. Buess: Der qualitative und quantitative Nachweis der «fixen» Luft (1756), ein Wendepunkt in der Geschichte der Chemie und Biologie (Experientia maiorum) 445
R. A. Boissonnas, St. Guttmann, J.-P. Waller, and P.-A. Jaquenoud: Synthesis of a Polypeptide with ACTH-like Structure (Studiorum Progressus) 446

Elektronenmikroskope
Elektronendiffraktographen
Hochspannungsoszillographen

Trüb, Täuber · Zürich

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XII/11

Birkhäuser Verlag, Basel/Stuttgart
Ciba AG., Basel
ETH, Zürich 6
Ganz & Co., Zürich
Kern & Co. AG., Aarau
Pergamon Press Ltd., London
Sandoz A.G., Basel
Benno Schwabe & Co., Verlag, Basel
Trüb, Täuber & Co., Zürich
Wild Heerbrugg AG., Heerbrugg
N. Zivy & Cie., S. A., Basel

Die EXPERIENTIA kann in folgenden Ländern durch die Post abonniert werden:
Des abonnements pour EXPERIENTIA peuvent être commandés près des bureaux de poste des pays suivants:

Italien	Belgien, Luxemburg	Dänemark	Schweden	Portugal
Deutschland	Holland	Norwegen	Finnland	Marokko

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an 36 francs pour la Suisse; pour l'étranger 46 francs. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 36.–, im Ausland sFr. 46.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.–, $^1/_4$ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 36.– per la Svizzera; all'estero sfr. 46.–. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription by inland mail is fr. 36.–; other countries sfr. 46.–. Prices in Swiss currency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

Copyright 1956 by Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 19, Telephon (061) 23 58 20; Telegrammadresse: Edita Basel

Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel

Mikro-Elektrophorese-apparat Kern, Modell LK 30

Interferometrische Registrierung des Konzentrationsverlaufs, zuverlässige, einfache Arbeitsweise und Auswertung.

Jetzt auch mit Simultanzelle zur gleichzeitigen Durchführung zweier Analysen.

Verlangen Sie Prospekte Med. 558 und Med. 564

Kern & Co. AG. Aarau gegr. 1819

EIDGENÖSSISCHE
TECHNISCHE HOCHSCHULE

Auf den 1. April 1957 ist die ordentliche

Professur
für landwirtschaftliche
Bakteriologie
und Gärungsbiologie

neu zu besetzen.

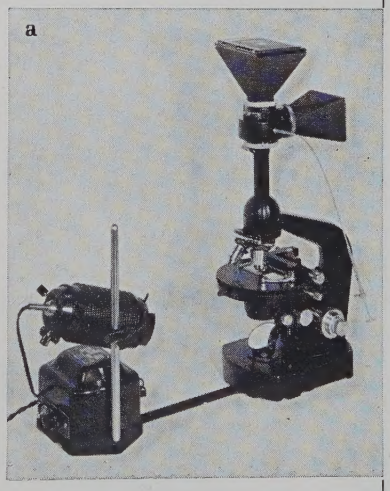
Interessenten, die gründliche Kenntnisse der Mikrobiologie sowie der Gärungsphysiologie besitzen, werden gebeten, ihre Bewerbungen mit Lebenslauf unter Beilage von allfälligen wissenschaftlichen Publikationen bis zum 30. November 1956 an den Präsidenten des Schweiz. Schulrates, Eidg. Technische Hochschule, Zürich 6, einzureichen, der auch weitere Auskünfte erteilt

b

Mikrophotographien

besser
einfacher
rascher

Wild offeriert zwei Ausrüstungen, die bei minimalem Aufwand hervorragende Resultate gewährleisten:



a

a) Forschungs-Mikroskop Wild M 20 mit Wild-Aufsatzkamera I, Einstellokular, Rollfilmkassette und leistungsfähiger Niedervolt-Mikroskopierlampe.

b) Forschungs-Mikroskop Wild M 20 mit Phototubus, Wild-Aufsatzkamera II, Kleinbildkassette und Einbaubeleuchtung.

WILD
HEERBRUGG

Prospekt Mi 619
kostenlos durch

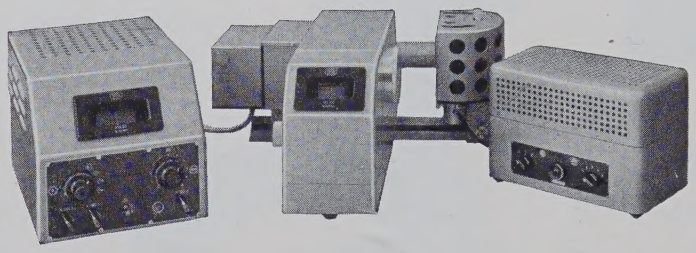
Wild Heerbrugg AG.
Heerbrugg / Schweiz

Das neue

ZEISS

Quarz-Spektralphotometer PMQ II

erfüllt Ihre Wünsche!



Bitte verlangen Sie den ausführlichen Prospekt Nr. 05–657/E

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

CARL ZEISS Generalvertretung für die Schweiz:

Beachten Sie die Vorteile:

- **Direktanzeige** des Meßwertes (ohne Einbuße an Meßgenauigkeit), dadurch Übersicht über das Absorptionsspektrum und Zeitgewinn.
- **Vollständiger Netzbetrieb.** Keine Akkumulatorwartung; jederzeit betriebsbereit.
- **Impulslicht – Wechselstromverfahren.** Dunkelstromeinstellung fällt weg und ebenso der feuchtigkeitsempfindliche Gleichstromverstärker (keine Trocknungspatronen mehr). Meßbereich: 200 bis 1000 mμ, nachträgliche Erweiterung bis 2500 mμ möglich.
- **Höchste Empfindlichkeit** durch Sekundärelektronen-Vervielfacher 1 P28.
- **Einfach-Monochromator** mit Quarz- oder Glasoptik oder **Doppel-Monochromator** mit auswechselbarer Quarz- und Glasoptik nach Wunsch.
- **Mikroküvetten** in Vorbereitung, welche ohne Beschneidung des Spaltbildes verwendet werden können, d.h. kein zusätzlicher Lichtverlust.

GANZ & CO
BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73
Zürich

Wenn Sie

HOCHVAKUUM-GERÄTE

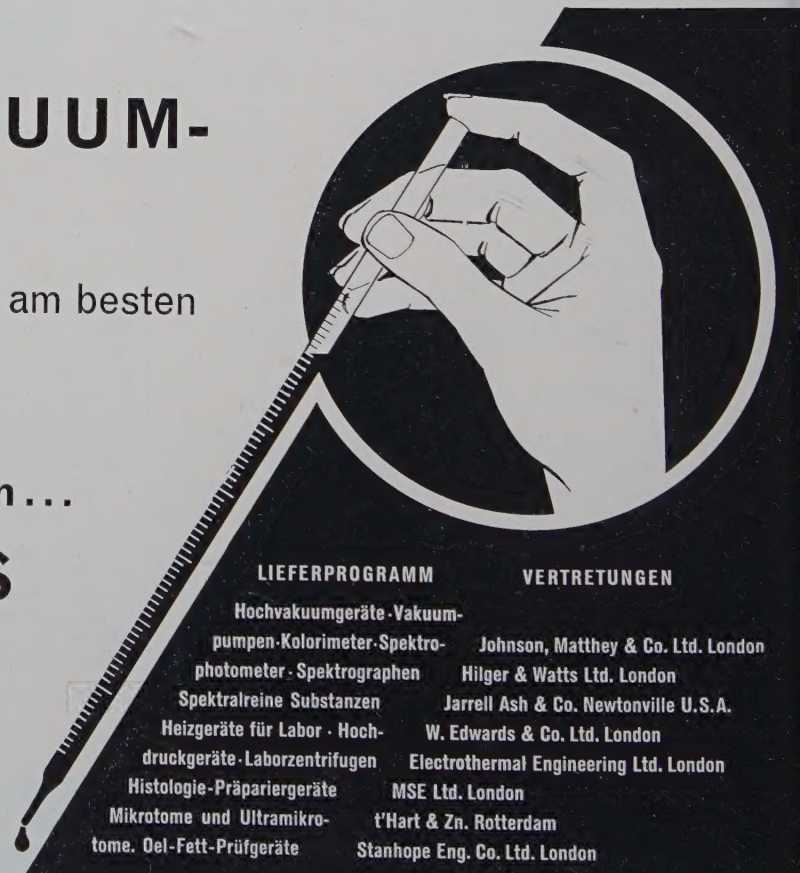
benötigen, wählen Sie am besten EDWARDS, denn:

für besseres Vakuum ...

EDWARDS

N. ZIVY & Cie S.A.

Basel, Spalenring 164, Tel. (061) 229786



LIEFERPROGRAMM

Hochvakuumgeräte · Vakuumpumpen · Kolorimeter · Spektrophotometer · Spektrographen
Spektralreine Substanzen
Heizgeräte für Labor · Hochdruckgeräte · Laborzentrifugen
Histologie-Präpariergeräte
Mikrotome und Ultramikrotome. Oel-Fett-Prüfgeräte

VERTRETUNGEN

Johnson, Matthey & Co. Ltd. London
Hilger & Watts Ltd. London
Jarrell Ash & Co. Newtonville U.S.A.
W. Edwards & Co. Ltd. London
Electrothermal Engineering Ltd. London
MSE Ltd. London
t'Hart & Zn. Rotterdam
Stanhope Eng. Co. Ltd. London

EXPERIENTIA

Vol. XII - Fasc. 11 Pag. 405–448 15. XI. 1956

Marine Fischereibiologie und allgemeine Meeresbiologie

Von A. Bückmann*, Hamburg

Die marine Fischereibiologie ist ein Zweig der angewandten Biologie. Damit ist gesagt, dass sie ihre Aufgabe darin zu sehen hat, die Erkenntnisse der reinen Biologie auf die nutzbaren Lebewesen des Meeres anzuwenden und bezüglich derselben so zu vertiefen, dass ein möglichst grosser wirtschaftlicher Nutzen aus ihnen gezogen werden kann.

Damit ist aber auch zugleich gefordert, dass die reine Meeresbiologie einen Vorsprung vor der Fischereibiologie haben muss. Es müssen ja Erkenntnisse vorhanden sein, die angewandt werden können. Wie hat es nun in der Geschichte der Meeresforschung mit diesem Vorsprung gestanden, wie steht es heute damit?

In der Tat ist die Meeresforschung einige Jahrzehnte älter als die Fischereibiologie. Sie erlebte ihren ersten Frühling um die Mitte des vorigen Jahrhunderts. Im Jahre 1845 war es, als Johannes Müller in Helgoland zum ersten Male feine Gazenetze benutzte, um Meeresplankton damit zu fangen. So eröffnete er den Biologen eine ganz neue Welt der Organismen, die bis dahin unbekannt war. Etwa zwei Jahrzehnte später fand man bei der Untersuchung des Meeresbodens für die Verlegung der transatlantischen Kabel entgegen den bisherigen Lehrmeinungen eine formenreiche Tierwelt in den grossen Meerestiefen. Das leidenschaftliche Interesse der Biologen an der Welt des Planktons und der Tiefseefauna gab die Veranlassung zu den grossen Meeresexpeditionen, angefangen vom Challenger 1872 bis 1876 bis zur deutschen Tiefsee-Expedition der Valdivia 1898, und zur Gründung der ersten biologischen Meeresstationen, vor allem der berühmten Zoologischen Station in Neapel durch Anton Dohrn.

Was aber war es, das eine ganze Forschergeneration mit solchem Einsatz und mit solcher Leidenschaft auf die Erforschung des Lebens im Meere ausrichtete? Es war die Tatsache, dass die vergleichend-anatomische und entwicklungsgeschichtliche Untersuchung der Meeresorganismen Entscheidendes beizutragen vermochte zur Begründung der Theorie, die das ausgehende 19. Jahrhundert im tiefsten bewegte, der Abstammungslehre. Das ganze Reich der Organismen als eine Einheit sehen und auch den Menschen darin einbeziehen zu dürfen, das erschien als ein zentrales Anliegen des Menschen, das zog die besten Geister magisch an, und die Erforschung der Meeresorganismen mit ihrer grossen Formenmannigfaltigkeit und ihrer zur Beurteilung stammesgeschichtlicher Zusammenhänge so wesentlichen Entwicklungszyklen und Larvenformen war hierfür unerlässlich.

Bei diesen Untersuchungen entwickelten sich aber auch bald ganz neue Fragestellungen, vor allem solche tiergeographischer Art. Die Gleichartigkeit der Tierwelt der circum-tropischen Zone, die Ähnlichkeit der Fauna beider Polargebiete wurden festgestellt und ihre Ursachen erörtert, die Tiefenverbreitung des Planktons untersucht u. a. m.

Nicht viel später als diese erste Forschungswelle erhob sich eine zweite, deren Anstoss nun aber praktisch-wirtschaftliche Fragen waren. Es handelt sich um die Ausnutzung des Meeres zur Volksernährung.

Die Seefischerei ist, wie wir wissen, Jahrtausende alt. Sie hat aber im vortechnischen Zeitalter nur zur Ernährung der Küstenbevölkerung beitragen können. Nur wenige ihrer Erzeugnisse eigneten sich zur Konservierung und zum Transport ins Binnenland. Das galt fast nur für den Hering, und das war wie bekannt eine Ausnahme von historischem und politischem Gewicht. Bei den Kämpfen zwischen England und Holland, beim Niedergang der Hanse spielte der Heringsfang eine Rolle.

Das Zeitalter der Technik lieferte sowohl den Anreiz wie die technischen Voraussetzungen zur Intensivierung der Seefischerei. Mit der Industrialisierung und der Zunahme der Bevölkerungsdichte wurde die Ernährung der Volksmassen ein Problem. Die Einführung der Maschinenkraft in die Seefischerei ermöglichte die Verwendung immer grösserer und wirksamerer Geräte, machte den Fang unabhängig von Wind und Wetter, rückte neue, ergiebige Fanggründe in den Bereich der Seefischerei. Die grössere Ausbeute an Seefischen aber konnte, durch Eis künstlich frisch erhalten, mit Hilfe der Eisenbahn schnell einem grossen Verbraucherkreis zugeführt werden. Grosse Flotten von Kuttern, Fischdampfern, Loggern und Driftern begannen die heimischen Meere zu bevölkern.

Es zeigte sich aber bald, dass die Erträge nicht unbegrenzt zu steigern waren. Die Ausbeute des einzelnen Fahrzeuges ging anfangs langsam, dann, wenn schon stark schwankend, immer schneller zurück. Man

* Institut für Fischereibiologie, Universität Hamburg.

musste immer neue und weiter entfernte Gebiete aufsuchen, um ausreichenden Fang zu sichern. Es entstand das Wort von der «Überfischung der Meere». Und noch ein anderes: Die Vorfahren waren es gewohnt gewesen zu warten, bis die Schwärme der Nutzfische an ihren Küsten erschienen, und wussten, dass die Ausbeute grossen, teils kurz-, teils langfristigen Schwankungen unterworfen war. Das war bei der neuen Wirtschaftsform unerträglich. Seit der Mitte des vorigen Jahrhunderts hatte sich an der Skagerrakküste der schwedischen Provinz Bohuslän eine ergiebige Winterfischerei auf Heringe entwickelt, die alljährlich viele Millionen Kilogramm lieferte. Schon in früheren Jahrhunderten hatte man hier und an der Westküste Norwegens solche Perioden reicher Heringsfänge gekannt, die gekommen und wieder gegangen waren. Jetzt brach die Bohuslän-Fischerei im Jahre 1896 ganz plötzlich wieder zusammen. Wo lagen die Ursachen solcher säkularen Schwankungen? Hatten die Heringszüge ihre Bahn geändert? Und wenn, weshalb hatten sie es getan, und wo konnte man sie jetzt fangen? War der Fischbestand des Meeres wirklich durch Überfischung bedroht? Konnte man durch intensive Fischerei einen Nutzfischbestand im Meere ausrotten, wie das nachweislich mit einzelnen Grosswildarten, Meersäugern usw. in historischer Zeit geschehen war?

Diese Fragen konnte die biologische Forschung jener Zeit nicht beantworten. Die bisherige systematisch-entwicklungsgeschichtlich-tiergeographische Forschung konnte dazu nichts beitragen. Nicht einmal die Entwicklungsstadien, geschweige denn der Lebenskreislauf der wichtigsten Nutzfische waren bekannt. Eine neue ökologisch ausgerichtete Meeresforschung musste diese Probleme zu lösen suchen.

So kam es, dass gleichzeitig und eng verbunden miteinander die reine Meeresbiologie ökologischer Prägung und die marine Fischereibiologie neu aufgebaut wurden. Sicherlich war es von Nachteil für die Fischereibiologie, dass die reine Meeresforschung nicht mit einem Vosprung vor ihr in das Rennen ging. Aber sie selbst hatte zunächst eine gewaltige Vorbereitungsarbeit zu leisten. Sollte der Ertrag der Seefischerei verbessert werden, so musste der Biologe die Seefischerei selbst und ihren Ertrag erst einmal kennen lernen, das heisst, es musste eine Anlandungsstatistik aufgezogen und durch Marktmessungen die Grösse der angelandeten Fische ermittelt werden; man musste die Entwicklungsstadien der Nutzfische, ihre Nahrung, ihre Wanderungen kennen lernen. Und andererseits hatte die reine Meeresforschung den Vorteil von dem massiven wirtschaftlichen Interesse, das hinter der Fischereibiologie stand. In allen seefischereitreibenden Ländern wurden jetzt Forschungsdampfer gebaut, man konnte die Apparate entwickeln und auf regelmässigen Forschungsreisen betätigen, die nötig sind, um Beschaffenheit und Bewegungen des Meerwassers zu erforschen und um seine Lebewelt vom einzelligen Plankton bis zum Nutztier zu fangen und der Beobachtung und Messung zugänglich zu machen. Neue Meeresstationen wurden gegründet, die in gleicher Weise und enger Gemeinschaft Fischereibiologie und allgemeine Meeresbiologie fördern sollten, so die Biologische Anstalt Helgoland.

Diese gemeinsame Arbeit war für beide Teile sehr fruchtbar. Das zeigt sich sehr schön an dem Lebenswerk der beiden führenden deutschen Meeresforscher dieser Epoche, Viktor Hensen und Friedrich Heincke.

Der Kieler Physiologe Hensen[1] und nach ihm Brandt[2], angeregt durch die fischereibiologischen Fragen, richteten ihre Forschungen von vornherein auf das Allgemeine und Grundsätzliche: Hensen begann, den Stoffhaushalt im Meere zu erforschen, eine Aufgabe, die in dieser gigantischen Allgemeinheit für festländische Räume unlösbar erscheint, die aber im Meere, in dem die äusseren Bedingungen über weite Areale hin verhältnismässig gleichförmig sind, mit Aussicht auf Erfolg angegriffen werden konnte. Als Ausgangspunkt wählte Hensen die Produktion pflanzlichen Planktons, des wesentlichen Erzeugers organischer Substanz im Meere, und entwickelte zu seiner Untersuchung die quantitative Planktonmethodik. Brandt ergänzte seine Arbeiten durch die Untersuchung der Minimumstoffe, vor allen Dingen der P- und N-Verbindungen, als der potentiellen Begrenzer der Pflanzenentwicklung. Ein rein wissenschaftliches Problem von grösster Tragweite wurde hier angefasst. Da aber der Umfang der Phytoplanktonproduktion letzten Endes auch die Fischproduktion im Meere bestimmt, so ergab sich dabei alsbald ein fischereibiologisch bedeutsames Ergebnis: Nur dort, wo das Phytoplanktonleben reich war, konnten die Lebensbedingungen für einen reichen Fischbestand gegeben sein, nur in solchen Gebieten brauchte man nach neuen Fangplätzen Ausschau zu halten. Und noch mehr: Die Eier der meisten Nutzfische sind planktonisch und können mit geeigneten Planktonnetzen quantitativ gefangen werden, und zwar innerhalb der begrenzten Laichzeiten auf den begrenzten Laichplätzen. Da nun aber die Eiproduktion unzweifelhaft eine Funktion der Grösse des Fischbestandes ist, ergab sich hier eine Methode zur Abschätzung dieser Grösse und ihrer Veränderungen, etwa ihrer Abnahme unter dem Einfluss der Fischerei. Und diese Methode war viel aussichtsreicher als der Versuch, die Grösse des Fischbestandes durch zahlreiche weit verteilte Fischfänge zu bestimmen!

Heincke[3] aber schuf in seiner Methode der Rassenuntersuchungen an Heringen als erster das Mittel, die

[1] V. Hensen, Jber. Comm. Untersuchung deutsch. Meere, Kiel 1877–1881, 1. Abt. Kiel (1887); 1882–1886 (1887).

[2] K. Brandt, Ber. deutsch. wiss. Komm. Meeresforschg. N. F. *1*, 67 (1924).

[3] Fr. Heincke, Jber. Comm. Unters. deutsch. Meere Kiel 1874–1876 und 1877–1881 (Kiel 1878 und 1882); Abhandlg. deutsch. Seefischereivereins *2*, 1 (1898).

Wanderung des Herings zu verfolgen. Damit konnte er die irrigen Anschauungen, die über dieses Phänomen im allgemeinen und die Ursachen der Heringsperioden an der Bohuslänküste im besonderen bestanden, widerlegen. Bei seinen Untersuchungen über die Rassenmerkmale aber, die er in den Proportionen des Heringskörpers, der Kopflänge und -Breite, der Stellung der Flossen und des Afters, der Zahl der Wirbel, Kielschuppen, Flossenstrahlen fand, wurde er tief in Variabilitätsstudien hineingeführt. Denn alle diese Merkmale wiesen eine grosse Variationsbreite auch bei Angehörigen derselben Rasse auf, und nur in den Mittelwerten unterschieden sich die Rassen mehr oder weniger weit in statistisch gesicherter Weise. Heincke konnte zeigen, dass es keines seiner Merkmale gibt, in denen sich nicht sogar die Variationsbreiten von Hering und Sprott gelegentlich überschnitten, wenn auch die Summe der Merkmale niemals einen Zweifel darüber liess, ob es sich um einen Hering oder einen Sprott handelte. Diese Befunde hatten grossen Einfluss auf die deszendenztheoretischen Vorstellungen seiner Zeit – sie lieferten ein erstes Modell dafür, wie die Differenzierung der Arten erfolgt sein könnte.

Wenn der Fischereibiologe Heincke der allgemeinen Biologie und der Physiologe Hensen der Fischereibiologie entscheidende Dinge zu sagen hatten, so ist das ein Beweis dafür, dass die gemeinsame Förderung der reinen und angewandten Meeresbiologie eine fruchtbare und aussichtsreiche Sache war, und sie ist es auch heute noch.

Wir können nicht den Gang der Forschung in den mehr als 6 Dezennien, die seither verflossen sind, hier verfolgen. Vollständigkeit wäre dann bei solchem Unterfangen ganz unmöglich. Es sind viele der Forschungen, mit denen man begann, auch heute noch nicht völlig abgeschlossen. Zum Beispiel ist bezüglich der Entwicklungsgeschichte der Meeresorganismen, besonders der Meeresalgen, noch vieles zu ergründen.

Von Bedeutung ist es dagegen darzustellen, wie in Verfolgung ihrer eigenen Probleme Fischereibiologie und allgemeine Meeresbiologie sich wieder in der Anwendung einer Forschungsmethode trafen. Die allgemeine Meeresbiologie war, stark beeinflusst durch die Forscherpersönlichkeiten eines Hensen, Petersen[4], Lohmann[5] u. a., zentral auf die Erforschung des Bevölkerungsproblems eingestellt, auf die Erforschung der Ursachen, die jeweils die Mengenentfaltung der Organismen und ihre Verteilung im Raume bestimmen. Dies Problem beherrschte zum Beispiel auch die biologischen Arbeiten der „Meteor"-Expedition[6].

Zwei Fragen schoben sich für die Fischereibiologie in den Vordergrund. Wie wandern die Fische und wie werden diese Wanderungen durch äussere Faktoren bestimmt und modifiziert?[7] und weiter: Welchen Einfluss hat die Fischerei auf die Nutzfischbestände[8]? Dieser letzten Frage zunächst suchte man dadurch näher zu kommen, dass man den Fischbestand laufend durch Stichproben untersuchte. Man hoffte, auf diese Weise den Einfluss der Veränderungen in der Fischerei zu erkennen, die infolge wirtschaftlicher und technischer Entwicklungen, vor allem aber infolge der Einschränkung der Fischerei während der Weltkriege und ihre Wiederaufnahme nach deren Schluss, im Fischbestand eintraten. Daraus glaubte man grundsätzlich den Einfluss der Fischerei auf die Bestände erkennen zu können.

Nun fand man freilich grosse Veränderungen in der Dichte, der Alters- und Grössenzusammensetzung[9], dem Wachstum der Fische[10], die nähere Analyse aber zeigte, dass diese nur zum Teil auf die Veränderungen der Fischerei, zum Teil aber auf naturbedingte, fluktuierende Schwankungen im Bestande zurückzuführen waren. Es stellte sich die methodische Frage, beide Erscheinungen voneinander zu trennen, die wissenschaftlich tiefere aber, Natur und Ursachen der natürlichen Schwankungen zu ermitteln.

Da zeigte es sich denn, dass der Nachwuchs, der aus dem Laichprozess eines jeden Jahres hervorging, sehr verschieden stark war. Es gab reiche, mittlere und arme Jahrgänge in unregelmässigem Wechsel. Die Entscheidung über den Ausfall der Jahrgänge aber fiel, wie man nachweisen konnte, in den ersten Lebensmonaten, während der pelagischen Entwicklungsphase. Die Schwankungen des Wachstums dagegen waren verschiedenen Ursachen zuzuschreiben: der Temperatur des Biotops oder der Nahrungsmenge, die dem einzelnen Individuum zur Verfügung stand, sei es, dass die Menge der Nährtiere selbst schwankte oder dass die verschiedene Menge der heranwachsenden Fische auf eine im wesentlichen – in der Summe verschiedener Nährtiere – konstante Nahrungsmenge angewiesen war.

Ausser diesen kurzfristigen Schwankungen, die man kurz und allgemein als Fluktuationen bezeichnet, haben wir in den letzten Jahren auch langfristige Schwankungen kennengelernt. Das Paradebeispiel ist die Erwärmung der polaren und subpolaren Gebiete der Erde und ihre biologischen Folgen, die in einer sehr erheblichen Faunenverschiebung bestehen[11]. Wahr-

[4] C. G. Joh. Petersen, Rep. Danish biol. Stat. *15* (1918).

[5] H. Lohmann, Wiss. Meeresunters. Kiel *10*, 129 (1908).

[6] E. Hentschel, Wiss. Erg. deutsch. atlant. Expedition «Meteor» *10*, 1 (1932).

[7] A. V. Taning, Cons. internat. Explor. Mer. J. Rapp. Proc. Verb. *89*, 3e pte. Nr. 2 (1934); Cons. internat. Explor. Mer *12*, 1 (1937).

[8] E. S. Russell, Cons. internat. Explor. Mer, Rapp. Proc. Verb. *110*, 5 (1939).

[9] *Fluctuations in the Abundance of the Various Year classes of Food Fishes*, 20 Arbeiten verschiedener Autoren, Cons. internat. Explor. Mer, Rapp. Proc. Verb. *65*, 1 (1930).

[10] *Rate of Growth*, 18 Arbeiten verschiedener Autoren, Cons. internat. Explor. Mer, Rapp. Proc. Verb. *108*, 1 (1938).

[11] *Climatic Changes in the Arctic in Relation to Plants and Animals*, 9 Arbeiten verschiedener Autoren, Cons. Perm. internat. Explor. Mer, Rapp. Proc. Verb. *125*, 5 (1949).

scheinlich haben wir es bei den vorerwähnten Heringsperioden mit verwandten Phänomenen zu tun.

Die Methode, mit der wir die aus alldem sich ergebenden Fragen angreifen mussten, war zuerst und zunächst die Durchführung von Terminfahrten. Man untersuchte ein möglichst ausgedehntes Gebiet wiederholt, sei es alle Jahre zur gleichen Jahreszeit oder auch öfter, etwa während der ganzen Zeit des Laichens und der planktonischen Jugendentwicklung einer Art. So stellte man einmal rein pragmatisch die Schwankungen in der Stärke der Jahrgänge, im Wachstum, in der Menge der erzeugten Brut, in der Ausdehnung und Richtung ihres Transportes mit den Meeresströmungen fest. Zugleich aber wurden Untersuchungen über die physiographischen Verhältnisse ausgeführt, so dass man ein Bild der hydrographischen Verhältnisse des Gebiets zu der betreffenden Zeit erhielt, der Wasserbewegungen und der Wasserbeschaffenheit. Dazu kamen dann aber auch die Verhältnisse des belebten Lebensraumes, das heisst die Mengenverteilung des Planktons nach Arten und Entwicklungsstadien, der Ablauf der Entwicklung, der Massenwechsel bei den Bodentieren usw.[12].

Man sieht, dass hier die Interessen der Fischereibiologie und der allgemeinen Meeresforschung wieder völlig zusammenliefen. Für beide handelte es sich darum, die Massenentfaltung des Meereslebens nach Arten und Entwicklungsstadien getrennt zu ermitteln und zu vergleichen mit der regionalen Verteilung der Umweltbedingungen und daraus Schlüsse zu ziehen auf die Ursache der verschiedenartigen Massenentfaltung. Die gleiche Methode bietet sich auch für die Analyse der Fischwanderungen, wobei mehr und mehr an die Stelle der zeitraubenden Versuchsfänge zur Ermittlung der Verteilung der wandernden Fischschwärme die Echoortung tritt[13]. Parallel dazu erfolgt natürlich wiederum die Bestimmung der Temperatur, des Salzgehalts, der Trübung, der Verteilung der Minimumstoffe, des Phytoplanktons.

Es sei bemerkt, dass man bei der Bestimmung der Planktonmengen bemüht ist, die zeitraubenden Zählungen zu vermeiden[14]. Man kann zum Beispiel statt dessen den Chlorophyllgehalt einer Wasserprobe mit dem darin enthaltenen Plankton photometrisch bestimmen und darf annehmen, dass dieser Gehalt ein Mass für die Menge des lebenden Phytoplanktons ist. Allerdings kennen wir noch nicht genau die Grösse des Fehlers, die dadurch entsteht, dass Chlorophyll abgestorbener Pflanzen im Detritus und im Wasser länger bestehen bleibt. – Die Bestimmung der Gesamtmenge des lebenden tierischen und pflanzlichen Planktons will man durch die chemische Bestimmung der Quantität des Eiweisses erreichen, hat aber auch dabei mit ähnlichen Fehlerquellen zu rechnen[15].

Die Entwicklung der reinen und angewandten Meeresforschung verlief nicht etwa nur in Deutschland und den in der „Internationalen Meeresforschung" zusammengeschlossenen nordeuropäischen Ländern in den hier geschilderten Bahnen, sondern in der ganzen Welt. Das zeigt ein Vergleich der Thematik der Veröffentlichungen des Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer (Kopenhagen) mit denen zum Beispiel der International Commission for Northwest Atlantic Fisheries, des Conseil International pour l'Exploration de la Mediterrannée, der Interamerican Tropical Tuna Commission (La Jolla), der International Fisheries Commission (Seattle), der Japanischen Meeresforschung und des Marine Research Coordination Council sowie der Veröffentlichungsreihen der einzelnen Länder und Institute. Die gleichen Ziele werden überall auf grundsätzlich gleichen Wegen angestrebt.

Bei alldem erfreut sich die Meeresforschung nicht eines so allgemeinen Interesses unter den Biologen, wie es bei der alten vergleichend-anatomisch-entwicklungsgeschichtlichen Forschung der Fall gewesen ist. Das liegt an der grundsätzlichen weiteren Entwicklung der gesamten biologischen Forschung. Das augenfällige Interesse hat sich anderen Dingen zugewandt. Auch die grosse Zeit der phylogenetischen Forschung ist vorübergegangen. Man fragte nicht mehr, wie der Stammbaum der Tiere aussieht, sondern wie die Mannigfaltigkeit der existierenden Formen durch das Zusammenspiel von Vererbung, Veränderlichkeit und Selektion entstanden zu denken ist. Zu diesem Zwecke beschritt man den Weg der experimentellen Genetik. Man suchte nach Ursachen und Wirkung in der Gestaltung der Individuen.

Das ist indessen nur ein Beispiel für die Hinwendung zur experimentellen Analyse der Kausalbeziehungen in der Biologie, zu dem, was Bünning im weitesten Sinne unter physiologischer Forschung versteht. Nun ist es die Methode dieser physiologischen Forschung, jeweils nur ein gewisses Reaktionssystem des Organismus ins Auge zu fassen und diese Reaktionen zu prüfen, wobei jeweils die Bedingungen der Umwelt konstant gehalten werden bis auf eine, die variiert wird. So werden, eine nach der anderen, die physiologischen Gesetzmässigkeiten erforscht.

Indessen fordert diese Art der Forschung einen einigermassen bequem zu handhabenden Organismus, und zwar nach Möglichkeit einen Organismus, dessen allgemeine Eigenschaften schon von vornherein einigermassen gut bekannt sind und nicht jeweils vor dem Experiment erst geprüft werden müssen. Am besten

[12] Cons. Perman. internat. Explor. Mer, Kopenhagen, Ann. biol. Vol. 1–11, 1939–1955.

[13] J. E. Furnestin *et al.*, Inst. Pêches Maritimes du Maroc. Bull. *1*, 3 (1953). – D. H. Cushing, Cons. internat. Explor. Mer, J. *18*, 45 (1952).

[14] H. Harvey, J. Mar. Biol. Assoz. Plymouth *19*, 761 (1934). – G. A. Riley, Internat. Rev. Hydrograph. Hydrobiol. *36*, 371 (1938). – J. Krey, Cons. intern. Explor. Mer *14*, 201 (1939).

[15] J. Krey, Kieler Meeresforschungen Kiel *8*, H. 1, 16 (1951).

fährt der Physiologe mit Organismen aus seit vielen Generationen unter Kontrolle gezüchteten Stämmen. Die meisten Meeresorganismen ertragen es nicht, dass eine grosse Anzahl von Umweltbedingungen willkürlich fixiert wird, und sie stehen nicht in alten Zuchtstämmen zur Verfügung. Die Züchtung von Meeresorganismen ist im allgemeinen keineswegs einfach, besonders nicht, wenn pelagische Stadien in den Lebenskreislauf eingeschaltet sind, und bei sehr vielen Arten ist der Generationsabstand recht beträchtlich. Die Tiere pflanzen sich erst nach einem oder mehreren Jahren fort. Es ist deshalb nicht verwunderlich, wenn sich die physiologische Forschung zunächst leichter zu handhabenden Organismen zuwandte. Möglicherweise hatte sie dabei den Nachteil in Kauf zu nehmen, dass sie bei einfachen Meerestieren die primitiveren Reaktionsweisen hätte kennenlernen können, bei den üblichen Versuchstieren aber von vornherein auf kompliziertere und spezialisiertere stiess.

Die natürliche Folge war ein gewisses Desinteresse der Biologie an den Meeresproblemen.

Die zentralen Probleme der Meeresökologie kann man nur schwer mit experimentellen Methoden angreifen. Dazu würde es gehören, den unabsehbaren Lebensraum des Meeres mit seinem örtlichen und zeitlichen Wechsel im kleinen unter kontrollierten Bedingungen nachzuahmen. Es leuchtet ein, dass das nahezu unmöglich ist. Aber die Methode der Meeresökologie, die wir früher geschildert haben, liefert uns Ergebnisse, die letzten Endes doch nur Deutungen sind, Deutungen vielleicht von so hohem Wahrscheinlichkeitsgrad, dass man sie ruhig als richtig annehmen kann. Wir haben mit grossem Erfolg versucht, aus den Experimenten zu lernen, die die Natur macht. Allerdings haben wir dabei keine Möglichkeit, die Versuchsbedingungen zu beeinflussen. Die Sicherheit der Schlussfolgerungen einer Kausalanalyse durch das in jeder Beziehung kontrollierte Experiment haben unsere Ergebnisse nicht.

Ich bin aber der Meinung, dass wir uns aus diesen Beobachtungen Vorstellungen gebildet haben, die doch nunmehr experimentell nachgeprüft werden können und müssen. Diese ersten Schritte auf diesem Wege sind, wie zu erwarten stand, ausserordentlich mühsam. Aber einige Ergebnisse sind doch bereits erzielt worden, die für die zentralen Fragen unseres Forschungsgebietes von Bedeutung sind. (Einige ziemlich willkürlich ausgewählte Beispiele sind unter [16] angeführt.)

Als Beispiel derartiger Untersuchungen können auch einige Versuchsreihen dienen, die im Max-Planck-Institut für Meeresbiologie in Wilhelmshaven begonnen und später in Hamburg fortgesetzt wurden. Man findet im Meer in bestimmten, teilweise sehr ausgedehnten Gebieten verschiedene Wasserarten übereinander geschichtet. Die Abgrenzung kann überraschend scharf sein. Innerhalb weniger Dezimeter können sich Temperatur und Salzgehalt nach der Tiefe zu sehr stark ändern. Man spricht dann von Sprungschichten. Diese Sprungschichten hatte das Forschungsschiff „Gauss" 1950 in der nördlichen Nordsee untersucht[17]. Bei den gleichzeitigen Echolotungen hatte es sich gezeigt, dass die Heringsschwärme, die sich des Tages in der Nähe des Bodens aufhalten, des Nachts in höhere Wasserschichten aufsteigen, und zwar gerade bis zu der in diesem Gebiet sehr scharf ausgebildeten Sprungschicht. Mit den selbstschreibenden Echoloten kann man heute die Bewegungen von Fischschwärmen sehr genau verfolgen. Bei Tagesanbruch gingen die Schwärme wieder zum Boden herab. Welchen Einfluss hat die Sprungschicht auf den Hering? Für eine etwas abweichende Fragestellung hatte Harder[18] auf meine Anregung eine Apparatur geschaffen, die es gestattete, Seewasser von verschiedener Beschaffenheit, etwa Nordsee-, Küsten- und Brackwasser, in Gefässen und Aquarien übereinander zu schichten. Die Versuchstiere konnten in beliebige Schichten eingesetzt werden. Als wir in so geschichtetes Seewasser Copepoden einsetzten, zeigte es sich, dass diese sich in Massen an der Grenzfläche zweier verschiedener Wasserarten ansammelten, während sie in den einzelnen Wasserkörpern nur in mässiger Zahl verteilt waren. Inzwischen hat man auch im freien Meer an geeigneter Stelle eine Planktonansammlung in der Sprungschicht nachweisen können[19]. Da nun der Hering vorzugsweise Copepoden frisst, so ist es durchaus möglich, dass das Aufsteigen in die Sprungschicht sich als eine Nahrungswanderung erklärt, andererseits ist auch die Deutung möglich, dass der Hering es nur vermeidet, in Wasser von andersartiger Beschaffenheit überzugehen, und dass er deshalb nicht durch die Sprungschicht hinaufstösst. Erste Versuche von Harder[20] mit Heringen in geschichtetem Wasser ohne Nahrungsgehalt lassen das als möglich erscheinen. Weitere Versuche müssen folgen. Weiter aber müssen wir die Fragen klären, auf welche Dichteunterschiede und auf welche Schärfe der Schichtung die Copepoden noch mit Ansammlungen reagieren und wodurch diese Reaktion eigentlich bedingt ist.

Eine experimentelle Ökologie ist, wie man sieht, möglich und kann Ergebnisse liefern, die die Deutung

[16] H. O. Bull, *Studies in Conditioned Responses in Fishes* I–IX, Rep. Dove Mar. Lab. Newcastle on Tyne IV: 1934, VI: 1935, VIII: 1937, IX: 1939. J. Mar. Biol. Assoz. U. K. Plymouth III: *20* 347 (1935); V: *20*, 365 (1935); VII: *21*, 1 (1936). – V. E. Shelford and E. B. Powers, Biol. Bull. Woods Hole *28*, 315 (1915). – C. E. Lucas, Cons. internat. Explor. Mer. J. *11*, 343 (1936). – P. Doudoroff, Biol. Bull. Woods Hole *75*, 494 (1938).

[17] G. Krefft, Fischereiwelt und Fischindustrie *3*, 93 (1951).

[18] W. Harder, Mitteil. fischereibiol. Abt. des Max-Planck-Instituts für Meeresbiol. in Wilhelmshaven *1*, 21, 28 (1952).

[19] K. Hansen, Cons. internat. Explor. Mer J. *17*, Nr. 1 (1950). – M. Gillbricht, Mitt. Inst. Fischereibiol. Univ. Hamburg *5*, 32 (1954).

[20] A. Bückmann, W. Harder und G. Hempel, Mitteil. fischereibiol. Abt. des Max-Planck-Instituts für Meeresbiologie in Wilhelmshaven *3*, 8 (1953).

von Beobachtungen im freien Meere sichert. Diese Forschungsrichtung ist für den Fortschritt der Wissenschaft nötig.

Wenn wir uns aber die Aufgabe stellen, experimentell zu prüfen, wie die Ansammlung der Copepoden in den Sprungschichten zustande kommt, so verlassen wir damit bereits das Gebiet der Ökologie und begeben uns auf das Gebiet der Physiologie. Die Ansammlung kann damit zusammenhängen, dass die Copepoden den Unterschied der beiden Wasserarten mit ihrem chemischen Sinn perzipieren und demgemäss reagieren, sie können aber auch den Dichteunterschied wahrnehmen, und schliesslich kann es sich um ein Phänomen handeln, das nur durch die Verlangsamung des Aufsteigens im leichteren Wasser und die Verzögerung des Absinkens im schweren herbeigeführt wird. Harder[21] zeigte, dass der chemische Sinn jedenfalls nicht beteiligt ist. Wurde eine Sprungschicht so gesetzt, dass ein scharfer Unterschied im Salzgehalt bestand, der Dichteunterschied aber durch Zusatz von Zucker ausgeglichen wurde, so erfolgte keine Ansammlung an der Grenze. Durch Zuckerschichtung allein aber war sie zu erreichen. Die Untersuchungen gehen weiter.

Diese Feststellung, dass der Meeresbiologe auf physiologische Forschung angewiesen ist, drängt sich uns auf Schritt und Tritt auf. Bei der Untersuchung der Überfischungsfrage, die die Fischereibiologie des Meeres vom ersten Tage an beschäftigt hat, sind wir zu der Erkenntnis gekommen, dass eine Ausrottung der Nutzfischbestände nicht zu befürchten ist. Wir haben aber die Wahl, ob wir unsere Fischerei einschränken und dann eine Ausbeute von verhältnismässig grossen und alten Tieren haben wollen oder ob wir sehr intensiv fischen wollen, wobei wir dann nur kleine und junge Fische, in freilich grösserer Anzahl, fangen werden. Die Entscheidung, was von beiden rationeller ist, hängt daran, ob aus einer als konstant vorgestellten Nahrungsmenge mehr Fischfleisch erzeugt wird, wenn viele Fische sich darin teilen müssen, oder wenn wenige ein um so reicheres Nahrungsangebot zur Verfügung haben. Wir haben hier wiederum Anlass zu einem ökologischen Experiment, und wir haben es auch bei uns in Angriff genommen[22]. Wiederum aber führten uns die Beobachtungen bei diesem Versuch zu stoffwechselphysiologischen Fragen, bei deren Klärung der Spezialist auf diesem Gebiet wird mitwirken müssen:

Die Gewichtszunahme variierte von Woche zu Woche sehr unabhängig von der Menge der aufgenommenen Nahrung. Ein störender Einfluss im Wasserhaushalt würde diese Beobachtung am einfachsten erklären. Diese Frage harrt noch der Untersuchung.

Und nicht allein die Fragen des Fischwachstums müssen vom Physiologen gefördert werden. In der Untersuchung der Phytoplanktonproduktion haben wir die Grenze dessen erreicht, was mit Hensens Methodik festzustellen ist[23]. Es ist unzulässig, aus einem grossen Bestand von Planktonpflanzen in einem Meeresgebiet ohne weiteres auf eine grosse Produktion von organischer Substanz durch diese Pflanzen zu schliessen. Bei höherer Temperatur verlaufen bekanntlich alle Stoffwechselvorgänge schneller. Es ist vorstellbar, dass unter solchen Bedingungen eine sehr grosse Produktion organischer Substanz erfolgt, dass aber die entstehenden Pflanzenzellen durch Tierfrass schnell wieder vernichtet werden, so dass der vorhandene Bestand jederzeit sehr klein ist. Umgekehrt kann ein grosser Bestand in kaltem Wasser mit einem der van't Hoff'schen Regel entsprechend langsameren Stoffumsatz und geringer Zehrung durch Planktonfresser weit geringere Stoffmengen produzieren. Auch hier verlangt der Fortschritt der Wissenschaft das ökologische Experiment und die Mitarbeit in diesem Falle des physiologischen Chemikers, der sich mit den Gesetzen der Assimilation befasst.

Aber hier geht es noch einen Schritt weiter. Hensen und seine Schule erkannten, dass die pflanzliche Produktion von dem Vorhandensein der Minimumstoffe abhängig sei, und sie verfolgten deshalb den Kreislauf dieser Stoffe im Meer. Es zeigte sich, dass die Stoffe, nachdem sie in organische Verbindungen überführt worden sind, meist durch eine ganze Reihe von Organismen passieren, am Ende aber wieder mineralisiert, in anorganische Verbindungen zurückgeführt werden. Hensen nahm an, dass diese Remineralisierung im wesentlichen das Werk von Mikroorganismen sein müsste.

Über diese Mikroorganismen und ihre tatsächliche Lebensleistung im Meere wissen wir so gut wie nichts. Es war eine Überraschung, als Höhnk[24] kürzlich feststellte, dass nicht nur die Bakterien, sondern auch die Pilze eine reiche Flora im Meere stellen, die bis dahin fast unbekannt war. Wenn wir den Stoffhaushalt im Meere jemals völlig verstehen wollen, so muss das Meer mikrobiologisch erforscht werden.

Zusammenfassend können wir das Folgende sagen: Welche Frage der Fischereibiologe immer angreifen möge, bei dem heutigen Stande der Wissenschaft ist er auf weitere Fortschritte der Erkenntnisse der reinen Meeresbiologie angewiesen, und niemand kann grösseres Interesse daran haben als er, dass die experimentelle Ökologie, die Physiologie der Meeresorganismen, die marine Mikrobiologie gefördert werden. Seine Probleme liegen sozusagen im Zentrum, und seine For-

[21] W. Harder, Mitteil. Inst. Fischereibiol. Univ. Hamburg *4*, 1 (1954).

[22] A. Bückmann, Mitteil. fischereibiol. Abt. des Max-Planck-Instituts für Meeresbiologie in Wilhelmshaven *1*, 8 (1952).

[23] H. W. Harvey *et al.*, H. Mar. Biol. Assoz. *20*, 407 (1935).

[24] W. Höhnk, *Studien zur Brack- und Seewassermykologie I–V*, Veröffentl. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven *1*, 115, 247 (1952); *2*, 52 (1953); *3*, 27, 199 (1955).

schung wird durch die Ergebnisse aller Zweige der reinen Meeresforschung gefördert.

Die reinen Forschungszweige, von denen hier die Rede war, müssen sich natürlich nach ihren eigenen Gesetzen ungehemmt entwickeln. Ein volles Verständnis der ursächlichen Zusammenhänge muss erarbeitet werden. Dann erst kann der Fischereibiologe diese Erkenntnisse für praktische Fragen nutzbar machen.

Wohl aber ist es ein berechtigtes Anliegen des Fischereibiologen, den Kreis der Forscher auf dem Gebiet der reinen Biologie darauf hinzuweisen, welch grosses Arbeitsfeld auf dem Gebiete der Meeresbiologie bisher noch unbearbeitet ist, und er wird auf das eifrigste bemüht sein, über den kleinen Kreis reiner Meeresbiologen hinaus möglichst viele Forscher zur Beschäftigung mit Meeresorganismen anzuregen und ihnen dabei die Hilfe zu gewähren, die er auf Grund seiner Erfahrungen und Ausrüstung leisten kann.

Es besteht keine Konfliktsituation zwischen reiner und angewandter Meeresforschung. Beide können durch die Förderung der Nachbardisziplin nur gewinnen. In der Methode gibt es keinen grundsätzlichen Unterschied: Es gibt nur eine Methode der Naturwissenschaft, die kausale Analyse der Erscheinungen. Diese Methode ist anzuwenden im einen Falle auf das geeignetste Objekt, im anderen Falle unter Benutzung der so gewonnenen grundsätzlichen Erkenntnisse auf das wirtschaftlich bedeutsame Objekt.

Summary

A review is given of the general development of marine biological research, both fundamental and applied. When marine fishery research was instituted, there was no lead from fundamental marine ecology, as would generally be the case from fundamental research to applied. But fundamental research profitted from the commercial interest in fishery science and was greatly promoted along with it. The mutual promotion of both lines of research is shown in the work of Hensen and Heincke. In modern times, one method has been found equally suitable for, and has been generally applied in, both lines of research: this is the establishment of the abundance and distribution of a single species and developmental stages in the sea on repeated cruizes of research vessels, in relation to the distribution of external conditions, such as temperature, salinity, currents, nutrients, food organisms and animal predators. Important indications concerning the influence of external conditions on populations could be derived from similar observations. At present, investigations in experimental ecology are urgently needed in order to corroborate the inferences drawn from these in situ-observations. Moreover, the progress of fishery research will to no small degree depend on increased investigations in marine animal physiology and in the microbiology of the seas.

Über Abwehrreaktionen bei Pflanzenkrankheiten

Von Ernst Gäumann[1], Zürich

Botanik ist die Lehre vom Leben, wie es sich äussert im Reiche der Pflanzen – und alles Leben ist auf der Stufe der Zelle artgleiches Leben. Die pflanzlichen, die tierischen und die menschlichen Zellen sind gleich gebaut und verhalten sich in ihren vegetativen Funktionen, in ihren chemischen Umsetzungen, in Wachstum, Teilung und Vererbung wesensgleich. Erst auf der Stufe der Zellverbände, der Gewebe und Organe, und bei der Organisation des gesamten Organismus haben sich der pflanzliche und der tierisch-menschliche Ast des Lebens auseinanderentwickelt und sind eigene Wege gegangen.

Angesichts dieser Einheit des Lebens auf der Stufe der Zelle kann es nicht überraschen, dass die pflanzlichen und die tierisch-menschlichen Zellen auf einen sie angreifenden Krankheitserreger in manchen Fällen wesensgleich antworten und ihn insbesondere mit ähnlichen Mechanismen abzuwehren versuchen.

1. *Die Mechanismen der Infektabwehr*

Wir betrachten vier Gruppen des wesensgleichen Verhaltens gegenüber einem Krankheitserreger, nämlich a) die chemischen, antiinfektionellen Abwehrreaktionen, b) die nekrogene Abortion, c) die histogene Demarkation und d) die Desensibilisierung.

a) *Die chemischen antiinfektionellen Abwehrreaktionen.* Die chemischen antiinfektionellen, das heisst gegen den eindringenden Erreger gerichteten Abwehrreaktionen der Pflanzen seien am Beispiel einer Wurzel-

[1] Institut für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich. Zahlreiche Angaben entstammen einem Untersuchungszyklus, der vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung wissenschaftlicher Forschung unterstützt wurde. Der Verfasser möchte den zuständigen Behörden auch hier seinen Dank wiederholen.

infektion gewisser erdbewohnender Orchideen besprochen. Ihre Wurzeln, nicht aber ihre Knollen, werden regelmässig vom Erdboden her durch bestimmte Mykorrhizenpilze infiziert. Was ist es, das diese Pilze von den Knollen fernhält?

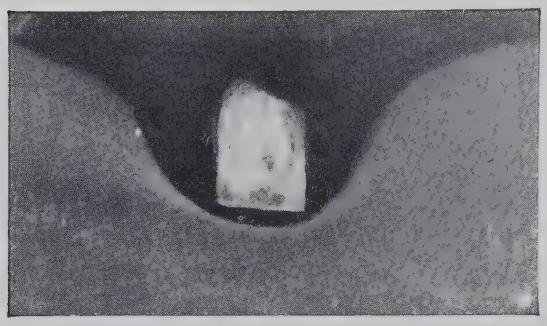


Abb. 1. Charakteristischer Hemmungshof, ausgelöst durch den Mykorrhizenpilz *Rhizoctonia repens* Bern. bei einer Knolle von *Orchis militaris*. $^2/_3$ natürlicher Grösse (Nach GÄUMANN, BRAUN und BAZZIGHER, 1950[2].)

Wir gewinnen aus einer Orchideenknolle aseptisch ein grösseres Stück, legen es in einer Petri-Schale vor eine heranwachsende Kultur eines dieser Pilze und stellen fest (Abb. 1), dass der Pilz in einem gewissen Abstand vor der Knolle aufgehalten wird; somit muss ein wachstumshemmender Stoff aus dem Knollenfragment in den Agar hinausdiffundiert sein.

2. Frage: Ist dieser pilzhemmende Stoff von Natur aus, präformiert, in den Knollengeweben vorhanden oder wurde er in ihnen (im Falle unserer Versuchsanordnung, vgl. Abb. 1) erst unter dem Einfluss der heranwachsenden Pilzhyphen neu gebildet?

Wir schneiden aus einer natürlichen Knolle aseptisch ein Stück heraus, töten es durch Kälte ab (welche den Hemmstoff nicht wesentlich schädigt) und legen es wieder vor eine heranwachsende Pilzkultur; es vermag nunmehr den Erreger nicht zu hemmen, sondern wird von ihm durch- und überwuchert (Abb. 2). Der pilzhemmende Stoff war somit in den intakten Knollengeweben nur in unzureichender Menge vorhanden und wurde zur Hauptsache erst in dem in Abbildung 1 gezeigten Knollenfragment unter dem Einfluss des heranwachsenden Erregers neu gebildet. *Er ist also das Produkt einer Antigen-Antikörper-Reaktion.*

Diese Antigen-Antikörper-Reaktion erreicht ihre volle Intensitätshöhe nach etwa 48 h; sie verläuft somit ungefähr ebenso rasch wie gewisse Abwehrreaktionen der Human- und Veterinärmedizin.

Die chemische Natur des Antikörpers wird im Organisch-chemischen Institut unserer Hochschule (Abteilung E. HARDEGGER) noch näher untersucht. Diese Dinge liegen nämlich in der Botanik ungleich komplizierter als in der Human- und Veterinärmedizin. Wenn ein Mediziner ein Pferd immunisiert, so kann er literweise Antiserum gewinnen; er *hat* dann den Antikörper in seiner Retorte und muss ihn nur noch chemisch definieren. Die Pflanze besitzt dagegen kein Blut und kein Serum, sondern nur Spuren von Zellsaft; und aus diesen Spuren von Zellsaft, die sich überdies unter dem Einflusse des Sauerstoffes der Luft sogleich chemisch verändern, soll der Botaniker bzw. der mit ihm zusammenarbeitende Chemiker Antikörper isolieren und in ihrer chemischen Konstitution aufklären. Dazu braucht es, die Umwege eingerechnet, viele Jahre.

Doch lässt sich jetzt schon sagen, dass der von den Orchideen gebildete Antikörper nicht zu den Eiweissen und nicht zu den Polysacchariden gehört, sondern einen lipoidlöslichen Neutralkörper darstellt. Dies dürfte biologisch bedeutsam sein. Bei den tierisch-menschlichen Abwehrreaktionen dominieren ja die Antikörper mit Eiweisscharakter (von den Gamma-Globulinen an aufwärts) in einem Ausmass, dass sie die anders gearteten Antikörper – falls es sie überhaupt gibt – vollkommen überschatten. Nachdem nun aber sichersteht, dass die Orchideen antiinfektionelle Antikörper mit Nichteiweiss-Charakter bilden, so lohnt es sich vielleicht doch, auch im tierisch-menschlichen Infektionsgeschehen erneut nach diesen primitiven, nicht eiweissgebundenen Abwehrmechanismen zu suchen.

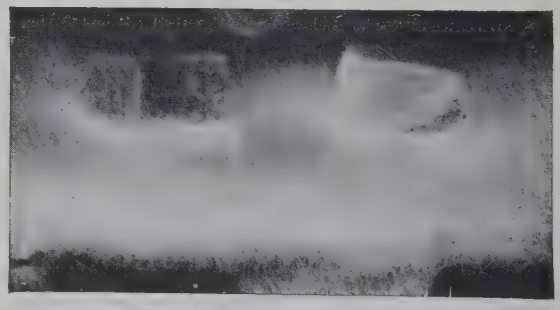


Abb. 2. Die Überwachsung abgetöteter Knollen von *Orchis militaris* durch den Mykorrhizenpilz *Rhizoctonia repens*. Natürliche Grösse. (Nach GÄUMANN, BRAUN und BAZZIGHER, 1950[2].)

Die übrigen sich hier stellenden Fragen: Wirkungsspektrum des Antikörpers, Natur und Spezifität des Antigens usw., fallen ausserhalb des Rahmens unserer Darstellung. Wesentlich ist im vorliegenden Zusammenhang nur, dass im pflanzlichen und im tierisch-menschlichen Ast des Lebens ähnliche chemische antiinfektionelle Abwehrmechanismen abrollen, mit dem gleichen «Ziel», nämlich den Erreger zu hemmen, ehe er zum Haften kommt. Verschieden ist bloss die *chemische Natur* des Stoffes, der im Verlaufe dieser wesensgleichen Abwehrreaktionen gebildet wird.

[2] E. GÄUMANN, *Pflanzliche Infektionslehre*, 2. Auflage (Birkhäuser, Basel 1951), S. 425.

b) *Die nekrogene Abortion.* Diesem gleichen «Ziel» der Infektverhütung, dem Aufhalten des eindringenden Erregers, ehe er zum Haften kommt, dient auch eine zweite Gruppe von wesensgleichen pflanzlichen und tierisch-menschlichen Abwehrreaktionen, die als «nekrogene Abortion» bezeichnet wird.

Abb. 3. Der Erreger des Kartoffelkrebses, *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc., ist bei *W* in die Epidermis einer krebsfesten Kartoffelsorte eingedrungen. Die benachbarten nichtinfizierten Wirtszellen sind abgestorben (schraffierte Partie). In einem weiteren Abstand haben innerhalb zweier Wochen zahlreiche Zellteilungen eingesetzt, die zur Ausstossung der Infektionspustel führen werden. 70fache Vergrösserung. (Nach KÖHLER, 1928[3].)

Wenn in dem Falle, der in der Abbildung 3 wiedergegeben ist, der Erreger einer bestimmten Pflanzenkrankheit sich anschickt, in die Wirtsgewebe einzudringen, so antworten die nicht unmittelbar infizierten, sondern bloss gefährdeten benachbarten Wirtszellen mit einer extremen Unverträglichkeitsreaktion, nämlich mit dem Tod. Innerhalb weniger Stunden oder Tage stirbt der mikroskopisch kleine Infektionsherd ab und reisst dabei den eindringenden Erreger mit in den Tod, eben die nekrogene Abortion: die durch den Tod (die Nekrose) ausgelöste Vernichtung (Abortion) der lädierten Wirtszellen, wobei der Erreger mit vernichtet wird.

Pflanzen vom Typus der Abbildung 3 bleiben also nicht deshalb befallsfrei, weil sie krankheitswiderstandsfähig sind (wie dies beim Typus der Abbildung 1 der Fall war), sondern im Gegenteil, weil sie überanfällig, überempfindlich sind und durch eine hyperergische Reizantwort einen kleinen Teil ihres Körpers opfern, zum Wohle des Ganzen.

Wesensgleiche Hypersensibilitätsreaktionen rollen auch im Tierreich und beim Menschen ab, so bei den Infektionsallergien. Verschieden ist nur die *Häufigkeit*, mit der zu diesem primitiven Mittel der Selbstvernichtung gegriffen wird: sehr selten im Tierreich und beim Menschen, verhältnismässig oft (bei bestimmten Erregern und bei einer bestimmten Reaktionslage des Wirtes) im Pflanzenreich.

c) *Die histogene Demarkation.* Selbstverständlich können die unter a) und b) genannten Methoden der Infektabwehr gelegentlich versagen, so dass der eindringende Erreger zum Haften kommt. Auch wenn dies geschieht, ist die Pflanze noch nicht unter allen Umständen verloren, sondern sie kann in manchen Fällen eine zweite Abwehrfront aufbauen. Das «Ziel» dieser zweiten Abwehrfront ist nicht, wie bisher, die Infekt*verhütung* – denn der Infekt haftet schon –, sondern ihr Ziel ist die Lokalisierung, Eindämmung, Abkapselung des zum Haften gekommenen Infektes.

Falls in unserer Lunge ein Tuberkuloseinfekt zum Haften kommt, so löst er im günstigen Falle die Bildung einer besonders beschaffenen Gewebekapsel, des sogenannten Granulationsgewebes mit den Epitheloidzellen, aus. Diese Kapsel lokalisiert den Infektionsherd (den «Focus») und bewirkt, dass die Bakterien nicht über den gesamten Körper streuen und dass die nekrogenen Abbaustoffe des zerfallenden Krankheitsherdes die benachbarten Lungengewebe nicht schädigen: eben die «Tuberkel»bildung, die histogene (gewebliche) Abgrenzung des lokalisierten Infektes.

Ähnliche Lokalisierungen des Infektionsherdes durch besonders beschaffene Demarkationsgewebe erfolgen bei zahlreichen Pflanzenkrankheiten. Wie Abbildung 4 zeigt, sind auf dem Blatt eines Salomonssiegels einige Pilzinfektionen zum Haften gekommen. Dem sich ausbreitenden Erreger vorauseilend, haben die Blattgewebe einen kräftigen, kompliziert gebauten, verkorkten Gewebering entstehen lassen, der den örtlichen Krankheitsherd abkapselt, seine Nahrungszufuhr unterbindet und die übrigen Blattgewebe vor dem Erreger und seinen Toxinen und vor den nekrogenen Abbaustoffen des absterbenden Focus schützt.

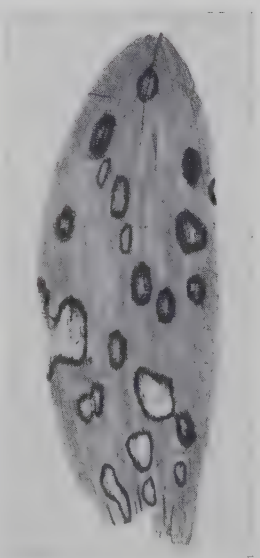


Abb. 4. Abgekapselte, abgestorbene und zum Teil schon ausgebleichte Infektionsherde der *Phyllosticta cruenta* (Fr.) Kickx auf einem Blatt des Salomonssiegels, *Polygonatum multiflorum* (L.) All. Die verkorkten Demarkationsgewebe sind dunkelbraun gefärbt. Natürliche Grösse. Original.

Bei gewissen Pflanzenkrankheiten kann es sogar geschehen, dass der Focus nicht nur abgekapselt, sondern überdies nachträglich wieder ausgestossen wird;

[3] E. GÄUMANN, *Pflanzliche Infektionslehre*, 2. Aufl. (Birkhäuser, Basel 1951), S. 395.

so sehen die Blätter der Kirsch- und Pfirsichbäume nach Befall durch den Erreger der «Schrotschuss»-Krankheit, *Clasterosporium carpophilum*, wie mit Schrot durchlöchert aus (Abb. 5); es sind dies die lokalisierten Infektionsstellen, die nachträglich von den benachbarten Blattgeweben wieder aktiv ausgestossen wurden.

Abb. 5. Schrotschusseffekt auf einem Pfirsichblatt, hervorgerufen durch einen Pilz, *Clasterosporium carpophilum* (Lév.) Aderh. Zahlreiche Infektionsherde sind schon abgegrenzt und ausgestossen worden; einige andere (dunkelgefärbte) Herde stehen im Begriffe, ausgestossen zu werden. Natürliche Grösse[4].

Der gleiche Vorgang der Lokalisierung und nachträglichen Ausstossung des Krankheitsherdes schützt unsere Buchen vor dem Erreger des Kastaniensterbens, *Endothia parasitica* (Murr.) Anders. An sich sind die Buchen für diesen Pilz anfällig, und der Infekt

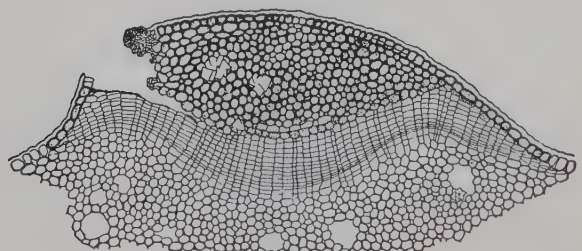


Abb. 6. Demarkation und Abschorfung eines Infektionsherdes auf einem Zweige der Mandel, hervorgerufen durch den Erreger der Schrotschusskrankheit, *Clasterosporium carpophilum*. 60fache Vergrösserung. (Nach SAMUEL, 1927[5].)

kommt auf ihnen zum Haften; doch setzt bei günstiger Reaktionslage des Wirtes sogleich eine Demarkation und Abschorfung des Focus ein (ähnlich Abb. 6), so dass der Pilz nicht zur Ausbreitung (Generalisation) im Innern des Wirtes und damit nicht zu seiner vollen pathogenen Auswirkung gelangt.

Ähnliche Demarkations- und Ausstossungsreaktionen erfolgen im menschlichen Körper bei eitrigen Metastasen, die auf dem Blutwege gesetzt wurden.

Das «Ziel» dieser histogenen Demarkationsreaktionen und ihr Erfolg sind somit im pflanzlichen und im tierisch-menschlichen Ast des Lebens wesensgleich: sie grenzen den Infekt, dessen man sich nicht erwehren konnte, ab, so dass er nicht zur Generalisation gelangt, und stossen ihn gegebenenfalls später wieder aus. Verschieden ist nur die *Häufigkeit*, mit der auch hier wieder zu einer Opferung kleiner Teile des eigenen Körpers geschritten wird: sehr selten im Tierreich und beim Menschen (die Tuberkelbildung und die eitrigen Metastasen dürften wohl die einzigen klaren Beispiele sein), sehr häufig dagegen im Pflanzenreich.

d) *Die Desensibilisierung.* Während die chemischen antiinfektionellen Abwehrreaktionen (*a*) und die nekrogene Abortion (*b*) den eindringenden Erreger fernzuhalten versuchten und die histogene Demarkation (*c*) den eingedrungenen Erreger gewissermassen in Schutzhaft nahm, werden durch die nunmehr zu besprechende Desensibilisierung die *Folgen* der Infektion abgeschwächt.

Desensibilisierungen beruhen darauf, dass die Reaktionslage eines Körpers durch die wiederholte Applikation eines Stoffes verändert wird, so dass er beispielsweise auf die zweite Applikation dieses Stoffes weniger stark anspricht als auf die erste. Die Humanmedizin kennt dieses Problem seit dem Altertum in der erworbenen Giftfestigkeit («Mithridatismus»); es bereitet auch den modernen Pharmakologen grosse Sorgen.

Eine bestimmte Welkekrankheit der Tomatenpflanzen wird durch einen Pilz, *Fusarium lycopersici* Sacc., verursacht, der vom Erdboden her durch die Wurzeln in den Spross eindringt und mehrere Toxine in die Leitungsbahnen des Wirtes übertreten lässt, unter ihnen das *Lycomarasmin*, ein Dipeptid. Wir fragen uns: Ist die Wirkung des Lycomarasmins gleich, wenn es bei einem akuten Infekt zum ersten Male auf die Wirtsgewebe auftrifft oder wenn es bei einem chronischen Infekt stets wieder *refracta dosi* in die zu schädigenden Gewebe gelangt?

350 gleichartige Tomatensprosse werden in 7 Gruppen von je 50 Stück geteilt und erhalten am 1. Versuchstage steigende Mengen Lycomarasmin verabreicht, von 0–300 mg je kg Lebendgewicht. Am 2. Versuchstage wird jede Versuchsgruppe in zwei Hälften von je 25 Stück zerlegt.

Die erste Hälfte jeder Versuchsgruppe bleibt unberührt; sie hat also nur am 1. Versuchstage die in der Abszisse der Abbildung 7 genannte Primärgabe erhalten. Am 4. Versuchstage zeigen diese Kontrollen

[4] E. GÄUMANN, *Pflanzliche Infektionslehre*, 2. Aufl., S. 438.
[5] E. GÄUMANN, *Pflanzliche Infektionslehre*, 2. Aufl., S. 440.

durchschnittliche Schädigungen im Ausmass der Kurve I (Abb. 7). Die *dosis letalis* liegt bei 300 mg Lycomarasmin je kg Lebendgewicht.

Die zweite Hälfte jeder Versuchsgruppe erhält am 2. Versuchstage einheitlich, also unabhängig von der Grösse der Primärdosis, die subletale Dosis von 150 mg Lycomarasmin je kg Lebendgewicht verabreicht. Die zweite Hälfte der 1. Versuchsgruppe erhält somit beispielsweise am 1. Versuchstage nichts, am 2. Versuchstage 150 mg Lycomarasmin je kg Lebendgewicht, die zweite Hälfte der 2. Versuchsgruppe erhält am 1. Versuchstage 12,5 mg, am 2. Versuchstage 150 mg Lycomarasmin je kg Lebendgewicht usw. Am 4. Versuchstage werden die Schädigungen abgelesen.

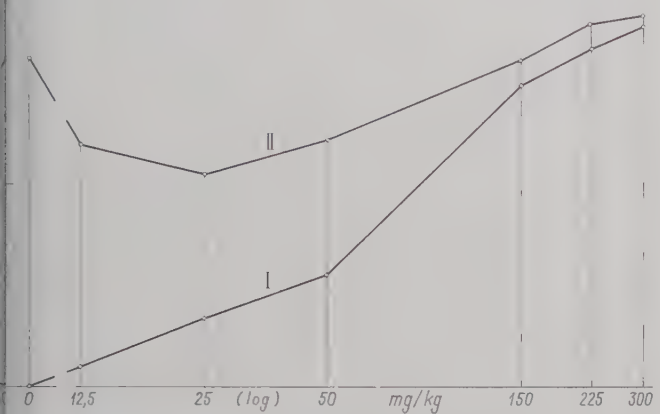


Abb. 7. Der Einfluss einer zweimaligen Lycomarasmingabe auf den Welke-Effekt bei Tomatensprossen. Als Primärdosis wurden die in der Abszisse logarithmisch abgetragenen Mengen Lycomarasmin je kg Lebendgewicht verabreicht; die durchschnittlichen Schädigungen sind in Kurve I wiedergegeben. 24 h nach der Applikation der primären Lycomarasmindosis erhielten die eigentlichen Versuchspflanzen einheitlich weitere 150 mg Lycomarasmin je Kilogramm Lebendgewicht zugeführt; die entsprechenden Schädigungen sind aus Kurve II ersichtlich. Die Ordinaten geben die durchschnittlichen Schädigungen in willkürlichen Einheiten wieder. (Nach GÄUMANN und NAEF-ROTH[6].)

Man hätte erwarten können, dass sich die Schädigungen der ersten und der sie unmittelbar überlagernden zweiten Dosis summieren würden; statt dessen zeigt die Kurve II der Abbildung 7 einen uneinheitlichen Verlauf. Im Bereich der Primärgaben von 12,5–50 mg Lycomarasmin je kg Lebendgewicht sind die Tomatensprosse durch die primäre Toxingabe *desensibilisiert* worden: sie sind durch die primäre Toxingabe anders geworden, als sie vorher waren, und sprechen auf die überlagernde zweite Toxingabe (150 mg je kg Lebendgewicht) schwächer an, als wenn diese Toxinmenge als erstmalige Gabe in ihre Gewebe gelangt wäre, und auch deutlich schwächer, als der Summe aus der 1. und der 2. Gabe entsprechen würde.

Den Mechanismus dieser Desensibilisierung kennen wir bei den Tomatenpflanzen ebensowenig wie beim Menschen. Wir wissen nur, dass die Desensibilisierung besteht und dass somit auch bei den Pflanzen die Reaktionslage bei wiederholter Applikation eines Toxines verschoben werden kann, so dass eine Pflanze bei einem chronischen Infekt auf dieselbe Menge eines Toxines unter Umständen schwächer anspricht als bei einem akuten Primärinfekt.

Es gibt demnach mindestens vier Formen der Infektabwehr, bei welchen sich der pflanzliche und der tierisch-menschliche Körper gegenüber einem ihn angreifenden Erreger wesensgleich verhalten. Doch ist dies alles, was die Pflanze kann; *der Mensch aber kann mehr*. Neben der hier geschilderten Infektabwehr durch gewöhnliche somatische Zellen besitzt er überdies *spezialisierte Kampfzellen*, die wegen ihrer funktionellen Spezialisierung weit mehr zu leisten vermögen als die gewöhnlichen Gewebezellen, nämlich einerseits das ortsgebundene reticuloendotheliale System und anderseits die mobilen Leukophagozyten.

Der tierisch-menschliche Körper ist deshalb dem pflanzlichen Körper in doppelter Hinsicht überlegen. Einmal wegen des Bestehens von *spezialisierten* Kampfzellen, ferner wegen der *Mobilität* eines Teiles dieser Kampfzellen: er kann Hunderttausende von beweglichen Leukophagozyten innert kurzer Frist an einer gefährdeten Stelle versammeln und auf diese Weise die Abwehrpotenz ganzer Gewebe und Organe schlagartig an *einem* Punkte einsetzen. Diese zusammengeballte Abwehr ist der Pflanze versagt, weil ihr starres Zellulosegerüst eine Verschiebung von Zellen ausschliesst. Bei der Pflanze muss deshalb jede gefährdete Zellgruppe, eine nach der andern, ihren eigenen Kampf mit dem Erreger ausfechten, ohne Unterstützung von fern her.

2. *Die topographische Reichweite des induzierten Schutzes*

In welchem Umkreis vom lokalen Infektionsherd wird der pflanzliche Körper durch die hier besprochenen Abwehrreaktionen geschützt? Die Verhältnisse liegen für die echten Abwehrreaktionen der Gruppe *a* und für die Überempfindlichkeitsreaktionen der Gruppe *b* etwas verschieden.

a) *Die topographische Reichweite bei echten Abwehrreaktionen.* In den *Blattgeweben* reicht die Feiung – falls eine solche überhaupt nachweisbar ist – bei lokalen Infektionen vom Typus der Abbildung 4 wohl selten über 1 mm hinaus.

Bei den homogener gebauten und deshalb einheitlicher reagierenden *Knollengeweben* ist bis jetzt nur das früher besprochene Beispiel der Orchideenknollen in dieser Hinsicht geprüft worden. Aus Orchideenknollen wurden unter aseptischen Bedingungen Säulen herausgeschnitten und nach der in Abbildung 1 gezeigten Art in Kristallisierschalen vor heranwachsende Pilzkulturen gestellt. Sie lösten die Bildung des üblichen

[6] E. GÄUMANN und ST. NAEF-ROTH, Phytopath. Z. *20*, 133 (1953).

Hemmungshofes aus. Nach 3 Tagen wurden die Säulen in Scheiben zerlegt und auf ihren Wirkstoffgehalt geprüft. Wird der Wirkstoffspiegel an der Basis der Säulen zu 100% gesetzt, so beträgt er in 1 cm Höhe 84% und in 2 cm Höhe noch 57% (GÄUMANN, BRAUN und BAZZIGHER[7]).

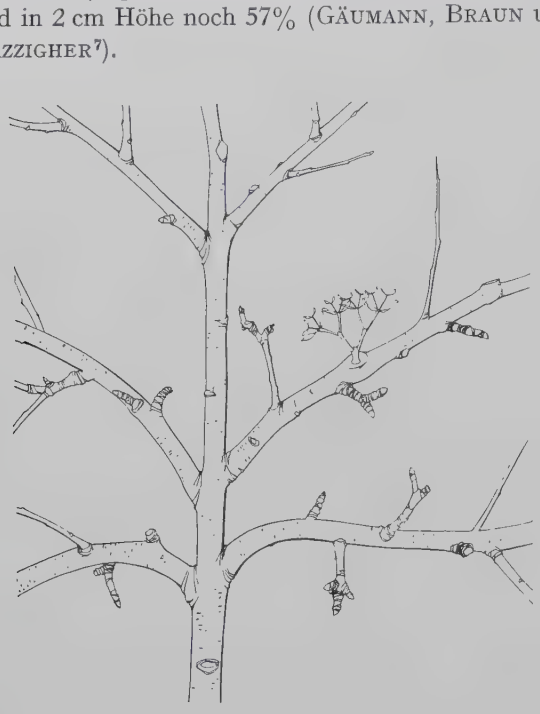


Abb. 8. Schema der Versuchsanordnung für die Superinfektion von Birnbäumen mit Misteln. Der mittlere Ast rechts trägt einen kleinen Mistelbusch.

Der an sich mögliche Einwand, der Wirkstoff sei bloss an der Basis der Säulen gebildet worden und von dort durch die Knollengewebe hinaufdiffundiert, dürfte nicht sehr tragfähig sein; denn für andere Beispiele wurde nachgewiesen, dass Knollen- und ähnliche Grundgewebe mehrere Zentimeter weit auf einen lokalen Infekt physiologisch antworten. Wird zum Beispiel eine Kartoffelknolle mit dem Erreger der Schwarzbeinigkeit, *Bacillus atrosepticus* van Hall, infiziert, so löst der lokale Infekt nicht nur in den unmittelbar infizierten Geweben eine Steigerung der Atmung und der Temperatur aus, sondern auch in den nichtinfizierten Geweben bis auf einen Abstand von etwa 4,4 cm vom Focus; hier erreicht zum Beispiel die pathologische Temperatursteigerung immer noch den etwa 8fachen Betrag der normalen Körpertemperatur[8].

Es ist biologisch kaum denkbar, dass der vom Focus ausgehende Reiz in den entfernten, nichtinfizierten Knollengeweben nur «Nebenerscheinungen» – eine Übersteigerung der Enzymtätigkeit und eine Hyperthermie – auslöst; wahrscheinlicher ist, dass in diesen Geweben auch gewisse Prozesse, die *gegen* diesen Reiz gerichtet sind, rascher abrollen, eben die Abwehrreaktionen. Wir glauben deshalb, dass ein lokaler Infek die Abwehrbereitschaft pflanzlicher Gewebe *in beson ders günstigen Fällen* bis auf einen Abstand von einige Zentimetern zu steigern vermag.

b) *Die topographische Reichweite bei Hypersensibili tätsreaktionen.* Linden, Apfelbäume, Pappeln, trage reichlich Mistelbüsche, Birnbäume nur selten, un wenn sie von Misteln befallen sind, so wird man be gewissen Sorten, so bei Williams Christ, auf *einem* As in der Regel nur *einen* Mistelbusch finden.

Die Ursache dieser Auslese liegt, wie der folgend Versuch zeigt, in einer induzierten Hypersensibilitäts reaktion bei der Sorte Williams Christ. Bei einer grös seren Zahl von Williams-Christ-Spalierbäumen mi gleicher Unterlage, gleichem Reis usw., wird im erste Versuchsjahr nach dem in der Abbildung 8 wieder gegebenen Schema an je *einem* Ast eine Mistelinfektio gesetzt. Im zweiten Versuchsjahr werden diese Bäum entweder am vorinfizierten Ast (proximal oder dista zum Primärherd) oder am nächsthöheren oder nächst tieferen Ast oder an einem der gegenüberliegende Äste mit Misteln infiziert, mit dem Ergebnis, dass di Infektionen überall im üblichen Prozentsatz angehe ausgenommen am vorinfizierten Ast; dieser antworte auf die Superinfektion mit bis 10 cm langen Nekrose (nach der in Abbildung 9 gezeigten Art), durch welch der eindringende Mistelkeimling wieder abgeschorf und ausgestossen wird.

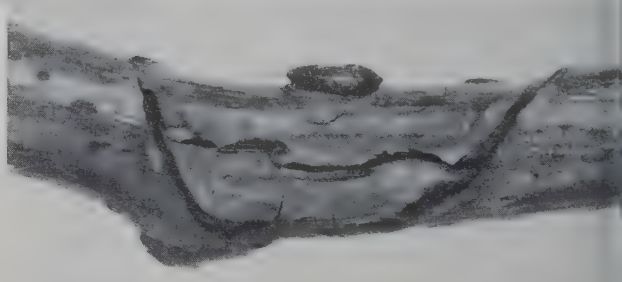


Abb. 9. Der Ast eines Birnbaumes antwortet auf das Eindringen eine Mistelkeimlings mit einer örtlichen Nekrose, durch welche der Keim ling nachträglich wieder abgeschorft und ausgestossen wird. 2,25fach Vergrösserung. (Nach PAINE[9].)

Die Birnsorte Williams Christ besitzt somit ange boren eine gewisse Labilität der Reaktionslage, näm lich eine Bereitschaft zur hyperergischen Reaktion Diese Bereitschaft wird durch eine Vorinfektion sensi bilisiert und führt auf dem Wege der nekrogenen Abor tion zur Befallsfreiheit vor Superinfektionen.

Der durch den lokalen Infekt induzierte Schut reicht somit in diesem Mistelbeispiel erheblich weite als bei den echten Abwehrreaktionen der Gruppe *a* nämlich nicht bloss über Millimeter und Zentimeter

[7] E. GÄUMANN, R. BRAUN und G. BAZZIGHER, Phytopath. Z. *17*, 36 (1950).

[8] E. GÄUMANN, *Pflanzliche Infektionslehre*, 2. Aufl., S. 601.

[9] L. A. PAINE, Phytopath. Z. *17*, 305 (1950).

sondern über einen ganzen Ast hin. Aber auch hier vermag der Baum nicht als Ganzes auf den lokalen Infekt zu antworten, denn er *ist* nicht eine in sich geschlossene Ganzheit wie wir Menschen. Er ist ja auch nie ausgewachsen. Wenn ihm der Wipfel abgeschlagen wird, so pumpen die Wurzeln Wasser nach, sei es, dass ihnen der Verlust des Wipfels nicht gemeldet wurde oder dass sie auf die Meldung hin ihre Tätigkeit nicht einzuschränken vermochten. Wegen dieser *konstitutionellen* Unfähigkeit zur Ganzheitsreaktion ist den Pflanzen eine humorale (den ganzen Körper feiende) Abwehrreaktion, wie sie den Warmblütlern und dem Menschen zukommt, von vorneherein versagt. Was sie leisten können, ist einzig die lokale, gewebliche Steigerung der Abwehrbereitschaft.

Auch der tierisch-menschliche Körper kennt derartige lokale Steigerungen der Abwehrbereitschaft, so in der Gewebeimmunität von Besredka. Grumbach[10] injizierte das Filtrat hochvirulenter Streptokokkenkulturen in markierte Stellen der Bauchhaut von Meerschweinchen und impfte nach 48 h tödliche Dosen derselben hochvirulenten Streptokokken in Abständen von 1, 2, 3 und 5 cm von der ursprünglichen Injektionsstelle in die Bauchhaut ein. In einem Bereich von etwa 1 cm von der Injektionsstelle war durch die Vorbehandlung eine derart gesteigerte Abwehrbereitschaft entstanden, dass die tödliche Dosis ohne weiteres ertragen wurde. Schon im Bereich von 2 cm war nur noch eine hemmende Wirkung zu erkennen, die jedoch nicht ausreichte, um das Tier vor dem Tode zu retten. Und in 3 und 5 cm Abstand von der Injektionsstelle war keine Schutzwirkung mehr vorhanden, und die Tiere gingen ein.

Durch die intrakutane Vakzination mit dem Streptokokkenfiltrat sind also die betreffenden Zellen und Gewebe *sensibilisiert* worden. Sie zeigen infolgedessen eine erhöhte Reaktionsbereitschaft, wodurch die eindringenden Mikroorganismen schon nahe dem Infektionsherd aufgehalten und vernichtet werden; es kommt deshalb nur zu einem *lokalen* Entzündungsherd. Diese erhöhte Reaktionsbereitschaft beschränkt sich aber auf die unmittelbarst benachbarten Gewebe und hat keine frei kreisenden Antikörper im Blut, also auch keine erhöhte Abwehrbereitschaft des übrigen Körpers, zur Folge. Nicht das *Blut* ist somit der Träger dieser lokalen Abwehrreaktionen, sondern es handelt sich um rein zelluläre, plasmatische Vorgänge, die sich (wie dies auch im pflanzlichen Körper geschieht) einzig durch Infiltration von den reagierenden Zellgruppen auf die unmittelbar benachbarten Gewebe, und nur auf diese, ausdehnen.

Bei der topographischen Reichweite des induzierten Schutzes besteht somit eine ähnliche graduelle Abstufung zwischen dem pflanzlichen und dem tierisch-menschlichen Ast des Lebens wie bei den Mechanismen der Infektabwehr. Gemeinsam ist dem pflanzlichen und dem tierisch-menschlichen Ast eine gewisse Fähigkeit zur *lokalen* Feiung der dem Focus unmittelbar benachbarten Gewebe; aber der Mensch kann mehr. Er kann auf einen lokalen Infekt überdies mit einer *humoralen* Ganzheitsreaktion antworten, die den gesamten Körper feit; diese ist dem pflanzlichen Körper versagt.

3. *Die Wirkungshöhe der Infektabwehr*

Eine ähnliche graduelle Differenzierung zwischen Pflanze und Mensch wie bei den Mechanismen der Infektabwehr und der topographischen Reichweite des induzierten Schutzes besteht auch hinsichtlich der *Leistungsfähigkeit* der Infektabwehr. Gemeinsam ist dem pflanzlichen und dem tierisch-menschlichen Ast des Lebens die Fähigkeit, einen Infekt im günstigen Falle aufzuhalten und ihn nach der in Abbildung 4 gezeigten Art zu lokalisieren.

Der Mensch aber kann mehr. Er vermag überdies den lokalisierten Infekt zu eliminieren und die Schadenstelle ausheilen zu lassen. Hierzu ist die Pflanze nur in bestimmten Fällen, so bei den Abschorfungs- und Ausstossungsreaktionen der Abbildungen 3, 6 und 9, imstande. Normalerweise sind die pflanzlichen Infektionskrankheiten unheilbar. Die Heilung, die Regeneration der geschädigten Gewebe, die *Wiederherstellung der Harmonie des Ganzen* ist der Pflanze in der Regel versagt. Die abgekapselten Infektionsstellen (Blattflecken) (Abb. 4) bleiben auf dem Blatt zeitlebens bestehen.

Diese geringere Leistungsfähigkeit der pflanzlichen Infektabwehr hängt möglicherweise mit der geringeren Vitalität des pflanzlichen Körpers zusammen. Die Eigentemperatur einer Kartoffelknolle beträgt rund 0,005° C; um diese fünf Tausendstelsgrad ist die Kartoffelknolle wärmer als die sie umgebende Luft. Unsere Körpertemperatur beträgt rund 37° C; sie ist also rund 7000mal höher als die der Kartoffelknolle. Entsprechend höher wird auch unser Stoffumsatz sein. Ein Organismus, der 7000mal intensiver lebt, wird zweifelsohne Dinge leisten, die dem weniger vitalen Partner unzugänglich sind.

4. *Die Dauer des induzierten Schutzes*

Bei unseren Kinderkrankheiten, so bei den Masern, hält der erworbene Schutz ein Leben lang vor, bei den Pocken etwa zehn Jahre. Bei der Tuberkulose währt dagegen die Umstimmung der Reaktionslage unseres Körpers nur so lange, wie der Primärherd besteht, und sie erlischt wieder mit ihm. Das Überstehen einer Erkrankung gewährt deshalb im Falle der Tuberkulose keinen Schutz gegen eine spätere Reinfektion.

[10] A. Grumbach, Z. Immunitätsforsch. exp. Ther. *57*, 1 (1928); Zbl. Bakt. [I. Abt.] *110*, Beih. 146 (1929).

Die Pflanze kennt nur diesen letzteren, primitiven Typus der Umstimmung der Reaktionslage: sie kennt nur die *infektionsgebundene Sensibilisierung*. Ein überstandener oder abgedämmter Infekt feit infolgedessen die Pflanze nicht vor einer späteren Neuerkrankung, sondern jede spätere Ansteckung wird in gleicher Weise abrollen wie jede frühere. Nehmen wir dem in Abbildung 8 gezeigten Ast den Mistelbusch weg, so wird er vergessen, dass er sensibilisiert war; denn die Pflanze besitzt nur ein geringes Erinnerungsvermögen: sie ist ahistorisch.

Wegen dieses geringen Erinnerungsvermögens kennt die Pflanze wohl – wie wir Menschen im Falle der Tuberkulose – die infektionsgebundene Verschiebung der Reaktionslage, aber sie kennt nicht – wie unser Körper im Falle der Kinderkrankheiten – eine das ganze Leben währende erworbene Immunität.

Summary

Plant cells, animal cells, and human cells react to a pathogen in many cases in a similar way and seek to ward it off by similar mechanisms. Especially the chemical anti-infectious defending mechanisms (Fig. 1 and 2), the necrogenic abortion (Fig. 3), the histogenous demarcation (Fig. 4–6) and the desensitization are similar. Besides this defence against infection by ordinary somatic cells, the animal body has especial fighting cells, viz. the reticuloendothelial system and the leucophagocytes. It is especially the latter which, owing to their mobility, enable the human organism to concentrate the defensive power of entire tissue complexes at one point with great rapidity.

With plants, a local infection normally increases the defence readiness of tissues in the vicinity of the focus only in an area of 1 mm; in rare cases only does this area spread over several centimetres. In reactions of hypersensitization, only one branch is sensitized, even in the most favourable cases (Fig. 8 and 9). The plant is not capable of a total reaction of the whole organism.

Defence against an infection produces in plants at the best an encapsulation of a local focus (Fig. 4), but a recovery, i.e. a restoration of the harmony of the whole, is not effected.

Contrary to the human organism, the plant increases its defence readiness only in close connection with the infection. As soon as the infection subsides, the sensitization subsides also. Thus the recovery from a disease gives a plant no protection against an infection at a later period.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Zur Kristallstruktur der Mineralien der Chabasit- und der Faujasitgruppe[1]

Im Laufe der Untersuchung von Mineralien der Chabasit- und der Faujasitgruppe wurden unter andern folgende vorläufige Daten erhalten:

1. *Faujasit* (G. B. und W. N.): Herkunft = Sasbach, Kaiserstuhl; Dreh- und Weissenberg-Aufnahmen ergaben die Gitterkonstante $a = 24{,}74$ Å und die Raumgruppe $O_h^7 - Fd3m$. Mit der Dichte $d_{\text{Lit.}(2)} = 1{,}923\ \text{g cm}^{-3}$ erhält man $Z \approx 192/7$ Formeleinheiten $(NaCa_{0,5})[Al_2Si_5O_{14}]$. 10 H_2O in der Elementarzelle, bzw. 28,6 Na, 14,8 Ca, 57,6 Al, 134,4 Si, 384 O, 262,3 (H_2O)-Atome pro Zelle.

Es war das Ziel, die Struktur auf möglichst *direktem* Wege abzuleiten. Dazu wurden folgende Wege beschritten: a) Methode der Ungleichungen. Da die wenigen grossen unitären Strukturamplituden $U_{hkl} \approx 0{,}4$, die meisten aber um 0,2 waren, erwies sich dies Verfahren als unanwendbar. b) Methode des isomorphen Ersatzes. Ein natürlicher Faujasitkristall wurde in einer $AgNO_3$-Lösung einem Ionenaustausch (Na, Ca$\longleftrightarrow$Ag) unterworfen und vom Ag-Faujasit alle nötigen Röntgenaufnahmen hergestellt und vermessen. Analoge Schnitte durch eine dreidimensionale Patterson-Synthese des natürlichen bzw. des Ag-Faujasites zeigten aber, dass die beiden Strukturen gar nicht streng isotop sind, indem die Ag-Ionen auch noch andere als nur die ursprünglichen Alkalilagen einnehmen. Dieser Weg führte daher auch nicht weiter. c) Superpositionsmethode. Die eben erwähnten Schnitte liessen aber erkennen, dass die Punktlage (48*f*) einen beiden Faujasiten gemeinsamen Gitterkomplex darstellt. Für den Ag-Faujasit wurde nun eine dreidimensionale (additive) Überlagerungssynthese berechnet, über den Gitterkomplex (48*f*) superponiert. Aus dieser Synthese konnte folgende plausible Struktur des Faujasites entnommen werden: das (Si, Al)O-Gerüst besteht aus kubooktaedrischen Käfigen (Fig. 1*a*, *b*), wie sie in den Ultramarinen und wahrscheinlich auch im Chabasit vorkommen [Si, Al = Ecken eines Kubooktaeders, das heisst einer Kombination eines Würfels mit einem Oktaeder, von Quadraten und regulären Sechsecken gleicher Kantenlänge = (Si-Si)-Abstand $\approx 3{,}09$ Å begrenzt]; diese Käfige sind gegenseitig wie die C-Atome

[1] Mitteilung Nr. 92, Abt. für Kristallographie.
[2] A. KNOP, *Der Kaiserstuhl* (Leipzig 1892).

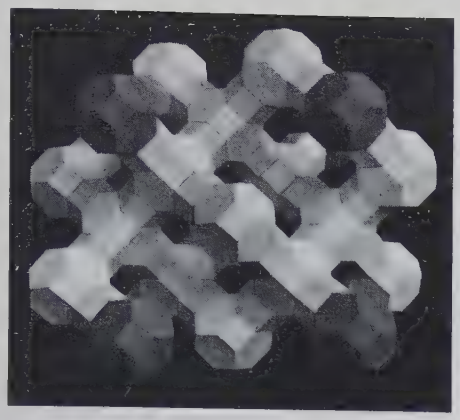


Fig. 1*a*. Modell der Si(Al)-Lagen (Ecken der Kubooktaeder) im Faujasit, parallel [100].

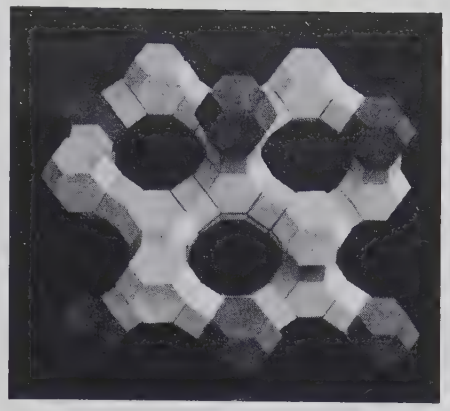


Fig. 1*b*. Ibid., parallel [110] die weiten Kanäle.

im Diamantgitter angeordnet und durch gemeinsame O-Atome, welche die Si(Al) tetraedrisch umgeben (in der Zelle sind 192 solcher über Ecken verbundene Tetraeder vorhanden), miteinander verbunden; die Alkali-Ionen und die Wassermoleküle scheinen innerhalb und an der Oberfläche der Käfige und im Innern der weiten Kanäle (von etwa 6–7 Å Durchmesser), welche parallel den Richtungen [110] die Struktur durchziehen und eine Erklärung für die besonderen Ionen-Austausch-Eigenschaften dieser Substanz liefern[3], zu sitzen.

2. *Gmelinit* (H. K. und W. N.): Herkunft = Bergen Hill (N. J.), USA. Von den fleischroten Kristallen wurden Pulver-, Schwenk- und Weissenberg-Aufnahmen hergestellt. Diese lieferten die Gitterkonstanten $a = 13{,}72$ und $c = 10{,}02$ Å [gegenüber $a = 13{,}74$ und $c = 14{,}83$ Å von Chabasit, das heisst c (Gmelinit) $\approx 2/3\ c$ (Chabasit)] und die Raumgruppen $D_{3h}^4 - P\bar{6}2c, C_{6v}^4 - P6_3mc$, $D_{6h}^4 - P6_3/mmc$ (Laueklasse = $D_{6h} - 6/mmm$) [gegenüber $D_{3d}^5 - R\bar{3}m$ von Chabasit]. Die Aufnahmen zeigen, dass es sich beim untersuchten Kristall um eine gesetzmässige Verwachsung einer ersten Kristallart (Gmelinit I) mit Chabasit handelt. Dabei ist auffallend, dass die Chabasitreflexe auf kontinuierlichen Verbindungslinien zwischen Gmelinit-I-Reflexen liegen [zum Beispiel zwischen $(40\bar{4}1)$ und $(40\bar{4}\bar{1})$], was auf eine gewisse Fehlordnung im Gmelinit-I-Gitter schliessen lässt. Im übrigen scheint der Gmelinit – der Ähnlichkeit der Aufnahmen nach zu schliessen – mit dem Chabasit strukturell sehr enge verwandt zu sein.

Wie wir erfahren, werden die Würfelzeolithe auch von H. O'Daniel (Frankfurt a.M.) bearbeitet; wir sind um eine sinnvolle gegenseitige Abgrenzung der Arbeitsgebiete bemüht.

Der eine von uns (G. B.) dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ein Auslandsstipendium bestens; unser verbindlicher Dank gilt ebenso dem Schweizerischen Nationalfonds und der Eidgenössischen Volkswirtschaftsstiftung für Unterstützung.

G. Bergerhoff, H. Koyama und W. Nowacki

Mineralogisch-petrographisches Institut der Universität Bern, den 12. September 1956.

[3] R. M. Barrer, W. Buser und W. F. Grütter, Helv. chim. Acta *39*, 518 (1956). – Wie uns Herr Prof. R. M. Barrer (London) freundlicherweise mitteilte, ist er sowie die *Linde Air Products* (USA) für das (Si, Al)-O-Gerüst zum gleichen Resultat gelangt (unpubliziert).

Summary

Preliminary results are given on the structure of faujasite and gmelinite.

Über 1-Halogenderivate des D-Glucosamins

Im Verlaufe von Untersuchungen, über die wir andernorts berichten, benötigten wir Halogenderivate des D-Glucosamins (2-Amino-2-desoxy-D-glucose), um daraus Glucosaminide herzustellen.

Kuhn und Kirschenlohr[1] beschreiben eine Methode, um von dem von Moggridge und Neuberger[2] dargestellten 1-Brom-3, 4, 6-N-tetraacetyl-D-glucosamin zu β-D-Glucosaminiden zu gelangen. Eigene Versuche, auf diesem Weg das Glucosaminid des *o*-Methoxy-benzylalkohols und andere Alkohole darzustellen, führten aber nicht zum Erfolg. Baker *et al.*[3] gelang die Kondensation dieses Bromides mit dem HgCl-Salz des 2-Methyl-mercapto-6-dimethylaminpurins ebenfalls nicht. Diese Autoren stellten aus β-Pentaacetyl-D-glucosamin mit ätherischer Salzsäure das α(?)-1-Chlor-3, 4, 6-N-tetraacetyl-D-glucosamin her, dessen Kondensation mit dem Purinderivat zum Erfolg führte. Wir haben dieses Chlorid durch Umkristallisieren aus Essigester gereinigt. Die reine Verbindung schmilzt bei 133–134° unter Zersetzung und hat einen Drehwert von $[\alpha]_D^{20}$: + 120° (in $CHCl_3$; $c = 2$). Das Chlorid wurde nach der Methode von Kuhn und Kirschenlohr[1] mit *o*-Methoxybenzylalkohol in guter Ausbeute zum 1-β-[*o*-Methoxybenzyl]-3, 4, 6-N-tetraacetyl-D-glucosaminid umgesetzt, Schmelzpunkt 165–166° (aus Essigester), $[\alpha]_D^{20}$: – 37,5° (in CH_3OH; $c = 2$). Verseifung der O-Acetylgruppen mit methanolischem Ammoniak lieferte 1-β-[*o*-Methoxybenzyl]-N-acetyl-D-glucosaminid, F: 210–211° (aus Alkohol), $[\alpha]_D^{20}$: – 56,6° (in H_2O; $c = 1{,}5$). Mit derselben Methode wurden auch die β-Methyl- und β-Benzyl-Verbindungen dargestellt, deren physikalische Konstanten mit den von Kuhn *et al.*[1] gegebenen übereinstimmen.

[1] R. Kuhn und W. Kirschenlohr, Chem. Ber. *86*, 1331 (1953); *87*, 384 (1954).

[2] R. C. G. Moggridge und A. Neuberger, J. chem. Soc. *1938*, 745.

[3] B. R. Baker, J. P. Joseph, R. E. Schaub und J. H. Williams, J. org. Chem. *19*, 1786 (1954).

Micheel, van de Kamp und Wulff[4] haben gezeigt, dass die von Moggridge *et al.*[2] erhaltene Verbindung α-1, 3, 4, 6-Tetraacetyl-D-glucosamin-hydrobromid ist und im IR-Spektrum keine charakteristischen Amidbanden besitzt. Im IR-Spektrum[5] des von uns erhaltenen Chlorides wurden nun bei 3,10 μ (N–H), 6,07 μ (O = C–N) und 6,48 μ (Amid–II) die zu erwartenden Banden gefunden, was eindeutig für das Vorliegen eines Amides spricht.

Demnach entsteht aus β-Pentaacetyl-D-glucosamin mit HBr in Eisessig das Hydrobromid des 1, 3, 4, 6-Tetraacetyl-D-glucosamins, während mit ätherischer HCl das 1-Chlor-3, 4, 6-N-tetraacetyl-D-glucosamin erhalten wird.

Ch. J. Morel

Pharmakologische Laboratorien der J. R. Geigy AG., Basel, den 17. Juli 1956.

Summary

Treating β-Pentaacetyl-D-glucosamin with ethereal hydrochloric acid leads to 1-Chloro-3, 4, 6-N-tetraacetyl-D-glucosamin, whose structure is proved by infra-red-spectra and transformation to known products.

[4] F. Micheel, F. P. van de Kamp und H. Wulff, Chem. Ber. *88*, 2011 (1955).

[5] Die IR-Spektren verdanken wir Herrn Dr. E. Girod, aufgenommen in Nujol, Perkin-Elmer, Mod. 21.

Fixation et inclusion du matériel nucléaire de *Escherichia coli*

Dans les coupes ultra-minces de bactéries, le noyau se présente soit entièrement rempli par une structure fine[1], soit sous forme de «vacuole nucléaire» contenant une ou plusieurs masses denses disposées au hasard[2]. Des figures de finesse intermédiaire ont été observées[3]. Dans un travail précédent[4] nous avons postulé l'hypothèse que ces structures nucléaires internes n'étaient pas significatives, c'est à dire qu'elles ne sont pas en rapport direct avec la constitution du noyau de la cellule vivante mais qu'elles ne sont que des formes de coagulation. Nous avons depuis lors étudié l'influence du pH et de certains cations sur la coagulation du nucléoplasme durant la fixation.

Cette étude a été faite sur des cellules de *Escherichia coli* cultivées en milieu tryptoné, traitées à l'auréomycine (1 h avec 4 γ/ml). Ce traitement permet d'obtenir une forme nucléaire simple et identique pour la totalité des cellules de la culture tout en les laissant toutes survivantes.

L'étude de l'influence du pH durant la fixation a été faite en employant de l'OsO_4 dissout à raison de 2% dans du tampon Michaelis ajusté à des pH allant de 6,0 à 8,0. On ajoute 4 ml d'acide osmique de pH désiré dans 40 ml de culture en tryptone de *E. coli* traitée à l'auréomycine, ce qui donne une concentration d'OsO_4 de 0,2%

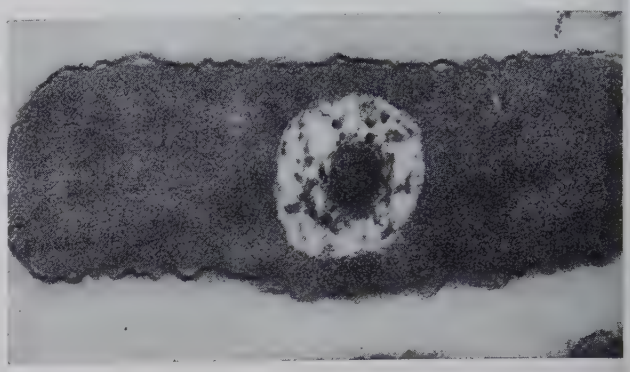


Fig. 1. *E. coli* K 12 S traité à l'auréomycine; fixé OsO_4 2% pH 7,2; inclus dans le methacrylate. Le matériel nucléaire est assez grossièrement précipité. Grossissement 50000 ×.

et un pH encore très voisin de celui de la culture avant fixation. On centrifuge et l'on reprend le culot dans 1 ml du même fixateur que l'on laisse en contact pendant 16 h à 20°. On lave en tampon du même pH que celui du fixateur et on reprend le culot dans une goutte d'agar 1,5% au même pH. L'agar est déposé sur une lame de verre, refroidi et découpé en petits cubes de 1 mm[3]. On procède ensuite à la deshydratation dans l'acétone en vue de l'enrobage soit au méthacrylate soit au polyester[5] (l'alcool n'étant pas miscible au polyester). Nous avons constaté sur des séries comparatives que la deshydratation à l'acétone n'entraîne aucun changement du matériel biologique par rapport à celle à l'alcool.

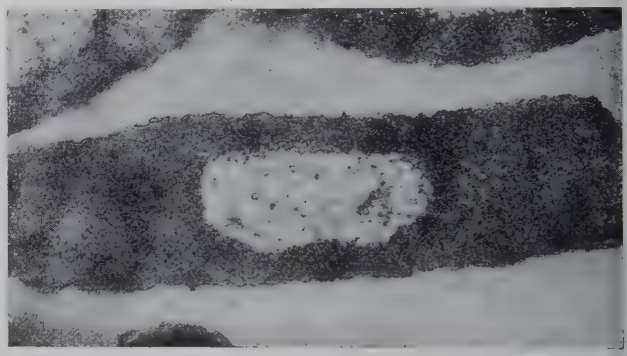


Fig. 2. Mêmes bactéries que celles de la figure 1, mais inclus au polyester. Le nucléoplasme est un peu plus fin. Grossissement 50000 ×.

L'inclusion au méthacrylate produit très souvent des gonflements et des déformations des cellules surtout lorsque le pH du fixateur est supérieur à 6. Ces artefacts ne se produisent jamais avec le polyester.

Les bactéries fixées aux pH 7,2 à 8,0 offrent toujours un nucléoplasme relativement grossier (fig. 1, dans le méthacrylate; fig. 2, dans le polyester). Au pH 6,0 le nucléoplasme est toujours beaucoup plus fin et l'adjonction de cations (0,01 M Mg et 0,0001 M Ca) au fixateur permet d'obtenir des résultats plus constants (fig. 3). Si l'on ajoute des ions La (0,03 M sous forme de nitrate) à

[1] G. B. Chapmann et J. Hillier, J. Bact. *66*, 362 (1953).

[2] A. Birch-Andersen, O. Maaløe et F. Sjöstrand, Biochim. biophys. Acta *12*, 395 (1953).

[3] J. R. G. Bradfield, Nature *173*, 184 (1954). – G. Piekarski, G. M. Pontieri, Zbl. Bakt. I Orig. *165*, 242 (1956). – O. Maaløe et A. Birch-Andersen, *Bact. Anatomy* (Cambridge University Press 1956), p. 261.

[4] E. Kellenberger et A. Ryter: Sch. Z. Path. Bakt. *18*, 1122 (1955).

[5] E. Kellenberger, W. Schwab et A. Ryter: Exper. même fascicule.

la place de Ca et Mg, on obtient des résultats similaires mais plus marqués; le cytoplasme est composé de grains assez nettement délimités qui sont probablement comparables aux grains de PALADE[6] et le nucléoplasme formé de

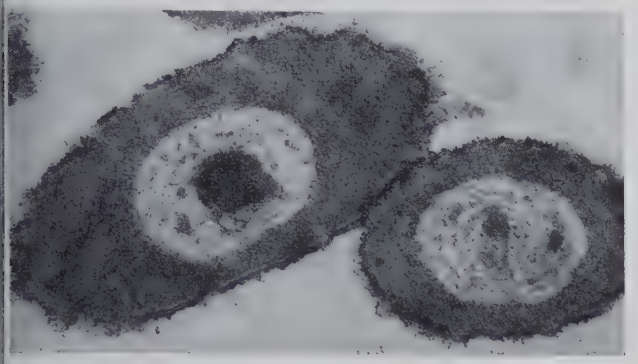


Fig. 3. *E. coli* K 12 S traité à l'auréomycine; fixé OsO_4 2% pH 6,0; inclus au polyester. Le matériel nucléaire est très finement précipité. Grossissement 50000 ×.

«filaments» très fins d'un diamètre de 50 à 70 Å (fig. 4). Ces observations en accord avec celles d'autres auteurs[7] nous prouvent qu'il est absolument indispensable de continuer des expériences systématiques sur la fixation

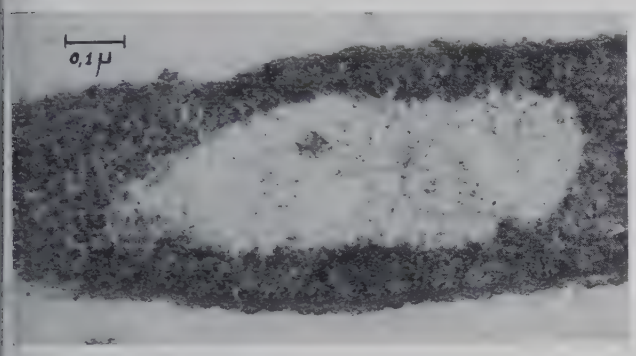


Fig. 4. Mêmes bactéries que celles de la figure 3, fixées au pH 6,0 avec adjonction de 0,03 M de $La(NO_3)_3$. Le noyau est formé de «filaments» d'environ 40 à 70 Å de diamètre. Grossissement 75000 ×.

et l'inclusion du matériel bactérien avant de discuter l'existence de mitoses avec fuseau et centrosomes[8].

Ce travail a été effectué dans le cadre d'une recherche subventionnée par le Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique.

E. KELLENBERGER et A. RYTER

Laboratoire de Biophysique de l'Institut de Physique, Université de Genève, le 2 juin 1956.

Zusammenfassung

In Abhängigkeit vom pH der Fixierungsflüssigkeit und vorhandener Kationen zeigt der Bakterienkern in Dünnschnitten entweder eine grobe oder aber eine feine Innenstruktur. Die als Chromosomenstrukturen gedeuteten Koagulationsbilder werden erneut in Frage gestellt.

[6] G. E. PALADE, J. Biophys. biochim. Cytol. *1*, 59 (1955).
[7] C. F. ROBINOW, *Bact. Anatomy* (Cambridge University Press 1956), p. 181.
[8] E. D. DELAMATER, Ann. Rev. Microbiol. *8*, 23 (1954).

L'utilisation d'un copolymère du groupe des polyesters comme matériel d'inclusion en ultramicrotomie

L'inclusion au méthacrylate, introduite par NEWMANN, BORYSKO et SVERDLOW[1] est actuellement la méthode la plus répandue pour obtenir des coupes ultraminces[2]. Elle présente cependant certains inconvénients: La polymérisation irrégulière du méthacrylate conduit à des duretés variables, à la formation de bulles plus ou moins nombreuses suivant le matériel inclus ainsi qu'à des gonflements très fréquents du tissu allant jusqu'à l'éclatement des cellules.

Ces difficultés nous ont conduits à chercher d'autres milieux d'enrobage et nous nous sommes arrêtés à un «polyester» préparé à partir de l'anhydride maléique estérifié avec l'alcool polyhydrique (glycérol, hydroabiétyl, etc.). Pendant cette estérification l'anhydride donne naissance à la forme *cis*, l'acide maléique, et à son isomère, l'acide fumarique, la forme *trans*. La co-polymérisation a lieu en présence de styrène et elle est amorcée par addition de 0,7 à 1% de catalyseur (peroxyde de benzoyle) et de 0,5% d'accélérateur (naphténate de Co)[3]. Les propriétés physiques de cette résine dépendent de l'équilibre entre les formes *cis* et *trans* de l'ester. La polymérisation doit commencer lentement et finir rapidement pour éviter les tensions internes: on maintient le «polyester» à 4° pendant 24 h puis on élève lentement la température jusqu'à 60° C afin d'obtenir ces résultats.

La méthode d'inclusion dans ce «polyester» est identique dans les grandes lignes à celle dans le méthacrylate[2]. Elle ne diffère que par une déshydratation à l'acétone à la place d'alcool éthylique, car le «polyester» est peu miscible à l'alcool. L'étude comparative entre ces deux déshydratations avec inclusion finale au méthacrylate nous a montré que ces séries parallèles donnent des résultats identiques. Le mélange d'esters monomères que nous avons employé est un liquide plus visqueux que le méthacrylate. Il se posait donc le problème de la pénétration à l'intérieur des cellules. Le passage brusque du tissu de l'acétone 100% au «polyester» pur provoque d'énormes contractions qui peuvent être presque totalement évitées si l'on introduit le tissu dans plusieurs mélanges d'acétone-«polyester» dont la proportion de «polyester» augmente progressivement.

Après fixation et lavage du tissu on déshydrate à l'acétone 25%, 50%, 75%, 95%, 100% pendant 30 à 60 min chacun. Puis on introduit 0,75% de catalyseur dans le «polyester» que l'on mélange ensuite en proportions variables avec l'acétone:

3 parties acétone sec — 1 partie «polyester» avec catalyseur, 30–60 min;
1 partie acétone sec — 1 partie «polyester» avec catalyseur, 30–60 min;
1 partie acétone sec — 3 parties «polyester» avec catalyseur, 30–60 min;
«polyester» seul avec catalyseur + 0,5% d'accélérateur, 30–60 min.

Ces quatre passages doivent se faire à 4° pour éviter un début trop rapide de la polymérisation. Le tissu est déposé au fond de capsules sèches de gélatine, remplies

[1] S. B. NEWMAN, E. BORYSKO et M. SVERDLOW, J. Res. nat. Bur. Stand. *43*, 183 (1949).
[2] F. S. SJÖSTRAND, Z. wiss. Mikr. *62*, 65 (1954).
[3] Les produits utilisés peuvent être obtenus au laboratoire Vinox, 10, avenue G. Werner, Genève, sous la désignation Vinox K3.

de «polyester» avec catalyseur et accélérateur, qui, enfermées dans une boîte contenant du desséchant, sont maintenues à 4° pendant 24 h, à 20° pendant 4 h et à 60° pendant 24 h.

Foie de souris fixé OsO_4 2% pH 7,2, inclus dans le « polyester». Grossissement 50000 ×.

Le polymère est plus dur et plus cassant que le méthacrylate. Il se coupe cependant très facilement à 200 Å avec des couteaux de verre cassés sous un angle d'environ 30°. Des angles plus grands ainsi que des couteaux métalliques aiguisés selon la méthode de Sjöstrand[2] fournissent des coupes plissées et gondolées.

Nous avons employé un microtome Trüb-Täuber modifié[4].

L'enrobage au «polyester» a été appliqué avec succès pour des fragments de foie (figure), pour des bactéries[5], des gamètes d'Allomyces, de jeunes racines et feuilles de diverses plantes[6]. Les bactéries et les gamètes ont été inclus dans de l'agar 1,5% immédiatement après la fixation pour faciliter les manipulations ultérieures[7]. Le même procédé, appliqué aux feuilles, permet d'orienter ces dernières dans la position voulue et empêche presque totalement leur détachement du reste du matériel d'inclusion.

La polymérisation du «polyester» employé est extrêmement régulière car sur une trentaine de séries d'inclusions nous n'avons jamais observé ni bulles ni gonflement. Des inclusions comparatives de bactéries dans du méthacrylate et dans du «polyester» ont montré de nombreuses fois que les bactéries avaient éclaté dans le méthacrylate mais étaient restées intactes dans le «polyester».

[4] E. Kellenberger, Exper. *12*, 282 (1956).

[5] E. Kellenberger et A. Ryter, Exper. même fascicule.

[6] Nous remercions vivement le Prof. E. Heitz et le Dr. G. Turian qui ont fourni ce matériel végétal.

[7] E. Kellenberger et A. Ryter, Schw. Z. Path. Bakt. *18*, 1122 (1955).

Ce travail a pu être effectué grâce à une subvention fédérale pour l'encouragement des recherches scientifiques au moyen des crédits ouverts par la Confédération pour procurer du travail.

E. Kellenberger, W. Schwab et A. Ryter

Laboratoire de Biophysique, Institut de Physique, Université de Genève et Laboratoire Vinox, Genève, le 2 juin 1956.

Zusammenfassung

Zur Herstellung von Dünnschnitten für das Elektronenmikroskop wird eine neue Einbettungsmethode für biologisches Material beschrieben. An Stelle von Methacrylat wird ein Polyester verwendet, wodurch Unregelmässigkeiten in der Polymerisation vermieden werden können. Sukzessive Serieneinbettungen und Vergleichsstudien können mit grösserer Sicherheit ausgeführt werden.

The Incorporation of Carbon Labelled Precursors into the Nucleic Acids of Various Tissues in the Intact Rabbit

We have previously described the pattern of incorporation of ^{32}P into the nucleic acids of rabbit tissues *in vivo*[1]. Since most previous studies on the incorporation of carbon labelled precursors into the nucleic acids of the intact animal have been restricted to only a few tissues (for reviews see Brown[2] and Smellie[3]), we have now examined the pattern of incorporation of carbon labelled formate, adenine and glycine into a series of rabbit tissues. For reasons of expense, the experiments were limited to a small number of animals and to a single incorporation time (2 h).

Female albino rabbits (about 1500 g) received 1 mc of the labelled precursor (^{14}C-formate, Na salt, or (2-^{14}C)-glycine or (8-^{14}C)-adenine sulphate) by intramuscular injection and the tissues were worked up to yield deoxyribonucleic acid (DNA), cytoplasmic ribonucleic acid (cRNA) and nuclear RNA (nRNA) as described by Smellie *et al.*[1]. The constituent bases after hydrolysis with 12 *N* $HClO_4$ at 100° for 1 h (Wyatt[4]) were separated by chromatography, using isopropanol-HCl[5] as descending solvent and butanol ammonia[6] as ascending solvent. The bases were eluted and quantitatively estimated as described by Crosbie *et al.*[7] and the radioactivity determined.

Wide variations were found in different animals but Table I shows some typical results for the purines and thymine. Incorporation into other pyrimidines was negligible. The pattern for DNA follows that found with ^{32}P, specific activities being high in such tissues as appendix and bone marrow in which cellular proliferation

[1] R. M. S. Smellie, G. F. Humphrey, E. R. M. Kay, and J. N. Davidson, Biochem. J. *60*, 177 (1955).

[2] G. B. Brown and P. M. Roll, Chapter 25, in *The Nucleic Acids* (edited by E. Chargaff and J. N. Davidson, New York Academic Press).

[3] R. M. S. Smellie, Chapter 26, in *The Nucleic Acids* (edited by E. Chargaff and J. N. Davidson, New York Academic Press).

[4] G. R. Wyatt, J. gen. Physiol. *36*, 201 (1952).

[5] G. R. Wyatt, Biochem. J. *48*, 584 (1951).

[6] W. S. MacNutt, Biochem. J. *50*, 384 (1952).

[7] G. W. Crosbie, R. M. S. Smellie, and J. N. Davidson, Biochem. J. *54*, 287 (1953).

Table I. — Specific activities of nucleic acid bases (in counts/min/μm) in DNA, nRNA and cRNA in various rabbit tissues 2 h after administration of carbon labelled precursors

Tissue	Base	^{14}C-formate			(8-^{14}C)-adenine			(2-^{14}C)-glycine		
		DNA	nRNA	cRNA	DNA	nRNA	cRNA	DNA	nRNA	cRNA
Appendix	Adenine	3849	2650	1326	10385	19600	13160	180	520	122
	Guanine	510	913	822	462	1258	618	(0)	179	(0)
	Thymine	1104	—	—	—	—	—	2	—	—
Bone Marrow	Adenine	3810	2204	1986	14781	21700	10348	207	267	(900)
	Guanine	1560	1286	1136	2371	2600	422	(0)	606	(0)
	Thymine	3815	—	—	—	—	—	26	—	—
Intestinal mucosa	Adenine	317	1356	(27)	4737	17700	12400	(0)	112	(0)
	Guanine	316	3460	1197	1566	3470	410	(0)	142	(0)
	Thymine	270	—	—	—	—	—	20	—	—
Kidney	Adenine	31	163	202	1	14932	4760	(0)	69	(0)
	Guanine	0	584	136	161	1411	(0)	(0)	(0)	(0)
	Thymine	33	—	—	—	—	—	17	—	—
Liver	Adenine	31	86	23	1009	16506	1177	16	87	(0)
	Guanine	163	168	43	208	642	22	(0)	(0)	(0)
	Thymine	45	—	—	—	—	—	—	—	—
Spleen	Adenine	167	728	231	5800	18700	1	24	100	—
	Guanine	154	412	122	2480	2750	1020	31	224	—
	Thymine	156	—	—	—	—	—	—	—	—
Thymus	Adenine	353	656	[1]	4720	9831	5080	63	262	13
	Guanine	478	544	[1]	252	787	125	(0)	254	15
	Thymine	1	—	—	—	—	—	(0)	—	—

[1] Specimens not available. – Figures in parenthesis are derived from counts too low to be significant.

is active and low in kidney and liver in which mitotic activity is low. The specific activities of the purines in nRNA are high and in most tissues exceed the corresponding values for DNA and cRNA purines except in appendix and bone marrow in which the DNA purines give particularly high values. Incorporation of (8-^{14}C)-adenine occurs readily into nucleic acid adenine (and to a much lesser extent into the guanine) especially in lymphatic tissues and bone marrow; the specific activities of the nRNAs are high and the difference between nRNA and cRNA is particularly pronounced in liver and kidney. Incorporation of (2-^{14}C)-glycine is much less extensive but the differences between tissues are similar to those found with the other precursors.

Previous results with ^{32}P were presented graphically[1] for various times and the figures found for a 2 h incorporation period are summarized in Table II which shows the same general pattern with ^{32}P as with ^{14}C-labelled precursors. In general the difference between nRNA and cRNA is more pronounced with ^{32}P than with carbon labelled precursors and is especially pronounced in liver and kidney.

Table II. — Relative specific activities of DNA, nRNA, and cRNA 2 h after administration of radioactive inorganic phosphate to rabbits (data derived from the curves of Smellie *et al.*[1]).

	DNA	nRNA	cRNA
Appendix	1373	3765	852
Bone marrow	1289	3837	861
Intestinal mucosa	258	959	243
Kidney	81	769	138
Liver	61	599	50
Spleen	154	2236	292
Thymus	434	2229	310

Bendich, Russell, and Brown[8] found the greatest uptake of ^{14}C-formate in the DNA of rat intestine and spleen and the least in brain, kidney, liver and testis, while Totter and his colleagues[9] have obtained results with formate incorporation into rabbit bone marrow with which ours are essentially in agreement. The incorporation of formate into DNA thymine which is of the same order as its incorporation into the DNA purines in nearly all tissues, is due presumably to the activity of the methyl group, which arises from C_2 intermediates[10]. *In vitro*, incorporation of formate is much more pronounced into thymine than into purines in bone marrow and Ehrlich ascites cells[11].

Comparison of the relative values for the DNA adenines in different tissues with respect to the utilization of different precursors shows a fair degree of agreement in the relative utilizations of the different precursors for DNA formation in accordance with the findings of Payne *et al.*[12] for the relative uptakes of carbon labelled formate, glycine, adenine and ^{32}P by mouse nucleic acids. Similar comparisons with RNA, however, show that the relative utilization of the different precursors in RNA formation is very different and that in several tissues adenine seems to be more readily incorporated into nRNA and cRNA than are formate or glycine.

[8] A. Bendich, P. J. Russell, and G. B. Brown, J. biol. Chem. *203*, 305 (1953).

[9] J. R. Totter, E. Volkin, and C. E. Carter, J. Amer. chem. Soc. *73*, 1521 (1951). – J. R. Totter, J. Amer. chem. Soc. *76*, 2196 (1955).

[10] D. Elwyn and D. B. Sprinson, J. Amer. chem. Soc. *72*, 3317 (1950).

[11] J. R. Totter, J. Amer. chem. Soc. *76*, 2196 (1955). – R. Y. Thomson, R. M. S. Smellie, R. Goutier, and J. N. Davidson, Biochem. J. *64*, 7 P (1956).

[12] A. H. Payne, L. S. Kelly, and H. B. Jones, Cancer Res. *12*, 666 (1952).

It has been suggested[13] that the biochemical stability of DNA in non-dividing cells is manifest only when ^{32}P and ^{14}C-adenine are used as precursors but in our experience the renewal patterns of DNAs from different tissues are quite similar regardless of the precursor used. The recent results of Sibatani[14] who with the aid of an improved technique, finds negligible incorporation of ^{14}C-formate into the DNA of resting rat liver *in vivo* and *in vitro* are in agreement with our view.

Preliminary measurements on the labelling of the acid soluble adenine compounds at 2 h show that with ^{14}C-formate and ^{14}C-glycine the highest activities are observed in those tissues in which DNA purines are most active, liver and kidney giving much lower values. This effect may be partly due to differences in purine synthesis and partly to variations in pool sizes in different tissues. The low values found for the activities of nucleic acid purines after ^{14}C-glycine administration are almost certainly due to a very considerable dilution of the administered glycine since the acid soluble nucleotides in these experiments also showed very low activities. The observed differences between the acid-soluble adenine nucleotides in different tissues after ^{14}C-adenine administration are considerably smaller than with formate or glycine.

This work was carried out with the aid of grants from the Medical Research Council and the British Empire Cancer Campaign. Our thanks are due to Dr. R. Y. Thomson for assistance in some of these experiments and to Mr. David Rankine for skilful technical help.

R. M. S. Smellie and J. N. Davidson

Department of Biochemistry, The University of Glasgow, Scotland, July 31, 1956.

Résumé

Les résultats expérimentaux montrent le degré d'incorporation du formate-^{14}C, de l'adénine-8-^{14}C et de la glycine-2-^{14}C dans l'ADN et dans les ARN nucléaire et cytoplasmique de l'appendice, de la mœlle osseuse, de la muqueuse intestinale, du rein, du foie, de la rate et du thymus du lapin *in vivo*.

[13] A. Bendich, P. J. Russell, and G. B. Brown, J. biol. Chem. *203*, 305 (1953). – D. Elwyn and D. B. Sprinson, J. Amer. chem. Soc. *72*, 3317 (1950). – G. A. Lepage and C. Heidelberger, J. biol. Chem. *788*, 593 (1951). – S. S. Furst and G. B. Brown, J. biol. Chem. *191*, 239 (1951).

[14] A. Sibatani, Biochem. J. *64*, 12 P (1956).

Reserpine and Human Platelet 5-Hydroxytryptamine

A decline in 5-hydroxytryptamine (5-HT) after the injection of reserpine into rats[1] and rabbits[2] and after repeated administration in man[3] has been reported. The observations described below show that in man a single dose will remove virtually the whole of the 5-HT in the platelets and that this is associated with an impaired ability of the platelets to absorb 5-HT.

The effect of 1 mg reserpine (i.m.) in man on the 5-HT content of the platelets and on their ability to absorb 5-HT

	ng 5-HT/10^8 platelets	ng 5-HT/10^8 platelets after incubation with 5-HT at 37° C for 2 h
Before reserpine . . .	36	173
1 day after reserpine	14	39
3 days after reserpine	< 1	36
9 days after reserpine	7	40

The methods used were those described by Hardisty and Stacey[4] and a typical result is recorded in the table. It will be seen that 24 h after the intramuscular injection of 1 mg reserpine the amount of 5-HT in the platelets had fallen to 40% of its initial level and that after 3 days none could be detected. Incubation of 5-HT with platelet-rich plasma obtained before administration of the drug led to a large uptake by the platelets[4] but 24 h after reserpine this ability to absorb 5-HT was markedly reduced and impaired absorption persisted during the following days. By the 9th day the 5-HT content of the platelets showed evidence of recovery; in other subjects recovery started at about the same time and was still incomplete 3 weeks after the injection.

The prolonged reduction of 5-HT following reserpine has been advanced by Shore *et al.*[2] as evidence that 'serotonin is formed in platelets at the time of their formation'. Bone marrow has little capacity for 5-HT synthesis and it would seem more likely, as postulated by Toh[6], that circulating platelets absorb 5-HT from organs where it is formed and that reserpine both liberates 5-HT from platelets and prevents further absorption.

Platelet life has been variously estimated from 5 to 9 days[7]. The present finding that at least 3 weeks is required for recovery after a single dose of reserpine suggests, since reserpine is rapidly eliminated[8], either that platelet life is longer than would appear from these estimates or that reserpine affects not only platelets in circulation but also the platelet bearing tissue, thus leading to the subsequent discharge of platelets with an impaired ability to absorb 5-HT.

R. M. Hardisty, G. I. C. Ingram, and R. S. Stacey

Departments of Pathology and Therapeutics, St. Thomas's Hospital Medical School, London, July 31, 1956.

Zusammenfassung

Nach einmaliger intramuskulärer Injektion von 1 mg Reserpin sinkt beim Menschen der 5-Oxytryptamingehalt der Blutplättchen zwei Tage lang ab, um bis zum neunten Tag auf unbestimmbarem Wert zu verharren.

[1] V. Erspamer, Lancet *i*, 511 (19–56) K. Naess and S. Schanche, Nature *177*, 1130 (1956).

[2] P. A. Shore, A. Pletscher, and B. B. Brodie, J. Pharmacol. *116*, 51 (1956).

[3] B. J. Haverback, P. A. Shore, E. G. Tomich, and B. B. Brodie, Fed. Proc. *15*, 434 (1956).

[4] R. M. Hardisty and R. S. Stacey, J. Physiol. *130* 711 (1955).

[5] J. H. Gaddum and N. J. Giarman, Brit. J. Pharmacol. *11*, 88 (1956).

[6] C. C. Toh, J. Physiol. *126*, 248 (1954).

[7] T. T. Odell Jr., F. G. Tausche, and J. Furth, Fed. Proc. *13*, 440 (1954). – C. H. W. Leeksma and J. A. Cohen, Nature *175*, 552 (1955). – S. Udenfriend and H. Weissbach, Fed. Proc. *13*, 412 (1954).

[8] P. Numerof, G. Maxwell, and J. M. Kelly, J. Pharmacol. *115*, 427 (1955).

Während dieser Zeit ist die 5-OT-Aufnahmefähigkeit der Plättchen vermindert. Der Oxytryptamingehalt der Plättchen erreicht seinen Ausgangswert erst ungefähr 3 Wochen nach der Reserpingabe.

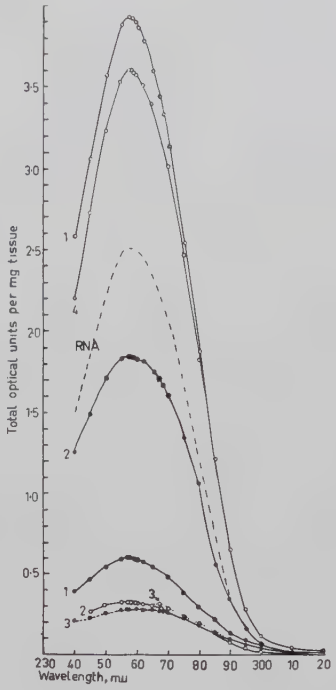
Die Ansicht, dass die Plättchen freies 5-Oxytryptamin aus dem Kreislauf aufnehmen, wäre mit diesem Ergebnis zu vereinbaren. Die Dauer des Effektes könnte bedeuten, dass Reserpin entweder auf Plättchenvorstadien im Knochenmark wirkt oder aber dass die Lebensdauer der Plättchen in Wirklichkeit länger ist, als neuerdings angenommen wird.

The Release of Ribonucleic Acid from Carnoy Fixed Sections During Incubation in McIlvaine's Buffer

Formaldehyde solutions have been preferred as fixatives for tissues prior to the histochemical ribonuclease (RNase) test, to the disadvantage of CARNOY's solution[1]. The main objection towards the latter is that sections incubated in a buffer without the addition of RNase, lose their staining properties for ribonucleic acids (RNA), just as in the presence of the enzyme. Thus, it is not possible, in the absence of a 'blank', to distinguish the effect of an 'un-specific' degradation of RNA and, perhaps, also of other substances due to the action of the buffer, from that of the specific enzymic break-down of RNA molecules. In contrast to this, in sections from formaldehydefixed tissues, RNA-containing structures still bind basic dyes after treatment with the enzyme-free buffer solution.

However, good solubility of RNA in Carnoy-fixed sections might indicate a better preservation of the native RNA molecules than after formaldehyde fixation. In that case, the ease with RNA is released from the fixed tissue will not affect the specificity of the test. Thus the main question seems to be whether substances other than RNA degradation products can be detected in the buffer extracts from Carnoy-fixed sections, and to what extend the release of RNA will be complete, as compared to digestion in the presence of RNase. The present communication reports the results from a comparative analysis of the ultraviolet absorbing substances liberated from CARNOY and formaldehyde-fixed tissues in McILVAINE's buffer, and in the same buffer containing RNase.

Experimental.– Fresh and frozen-dried pieces of rat pancreas were fixed in CARNOY's solution (ethanol: chloroform: acetic-acid – 6:3:1) for 1·5 h, or fresh pieces in buffered (pH 7·0) 10% formaldehyde solution[2] for 24 h at room temperature. They were transferred *via* the appropriate intermedia to paraffin (m.p. 55°C), as described elsewhere in detail[3]. From each paraffin block, 7 μ thick sections were cut, and distributed equally between centrifuge tubes in such a way that all the tubes contained comparable lots of the material. Some sections were mounted on slides for histochemical control. After deparaffination in petroleum ether, the sectioned material was spun down in a centrifuge, further washed with ether, and allowed to dry at room temperature. The samples were weighed, and each tube contained approximately 10 mg dry material. Some tubes with sections from fresh Carnoy-fixed and frozen-dried Carnoy-fixed tissue were submitted to secondary fixation in the buffered formaldehyde solution for 24 h. They were then freed from the formaldehyde through dialysis in cellophane sacs against distilled water in the cold room for 24 h. Thus the experiments included samples of sections which had been fixed accordingly: (1) Fresh Carnoy fixation. (2) Frozen-dried Carnoy-fixed. (3) Fresh formaldehyde fixation. (4) Frozen-dried Carnoy-fixed and then formaldehyde-fixed.



McILVAINE's buffer was used at pH 7·0, in the digestion experiments containing 1 mg crystalline ribonuclease (WORTHINGTON) per milliliter. Incubations were performed at 37° C for 2 h, and with mechanical stirring. The sections were spun down between each treatment, and the supernatants collected. 5 ml samples were used throughout. To test the completeness of the RNAS digestion, the sections were extracted with *N* perchloric acid for further 3 h at room temperature, as appropriate for pancreatic tissues[3]. Thus, in the actual set of experiments, each of the four types of preparation was treated according to the following scheme: (1) McILVAINE's buffer for 2 h. (2) RNase containing buffer for 2 h. (3) *N* perchloric acid for 3 h. All experiments were performed in double. In addition, direct digestion with RNase containing buffer for two times 2 h was performed on all types of preparation.

The supernatants were investigated in the Beckman Modell DU quartz spectrophotometer in the ultraviolet range, using 10 mm cells, against the corresponding solutions as a blank. Making use of the known volumes and weights of the samples, the absorptions were calculated as total optical units per milligram tissue, and are thus given in the graph.

The results are presented in the Figure. The curves with the un-filled circles represent the results from incubation of frozen-dried Carnoy-fixed sections. Curve 1

[1] R. E. STOWELL and A. ZORZOLI, Stain Techn. *22*, 51 (1947). – B. P. KAUFMANN, H. GAY, and M. R. MCDONALD, Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. *14*, 85 (1950). – A. G. E. PEARSE, *Histochemistry* (Churchill, London 1954). – N. B. KURNICK, Int. Rev. Cytol. *4*, 221 (1955).

[2] R. D. LILLIE, *Histopathologic Technic* (Blakiston, Philadelphia 1948).

[3] S. LAGERSTEDT, Z. Zellforsch. (in press.).

shows the absorption of McIlvain's buffer extract, and curve 2 that of the following RNase digest. Obviously, only very small amounts of RNA were left in the sections after extraction with the buffer solution. The curve from the *N* perchloric acid extract (curve 3) coincides extremely well with that from the RNase digest, indicating the completeness of the digestion. Curve 1 shows close similarity to a curve from a primary digest of sections with RNase under corresponding conditions (curve 4). The quotient *E* 257 mμ/*E* 275 mμ of about 1·5 for both curves, and the coinciding absorption maxima at 257 mμ, are in agreement with the curve from a digest of protein-free yeast nucleic acid in the same system (the dotted reference curve), indicating the absence of appreciable amounts of proteins.

The curves with the filled circles demonstrate the results with frozen-dried Carnoy-fixed and then formaldehyde-fixed sections. McIlvaine's buffer alone (curve 1) will remove about 20% of the total absorption at 257 mμ, but the main bulk of the absorbing substances is liberated in the following digestion with RNase (curve 2). Curve 3 (*N* perchloric acid extract) shows the completeness of the RNase digestion.

The same results are obtained using fresh Carnoy-fixed, fresh formaldehyde-fixed, or fresh Carnoy- and then formaldehyde-fixed tissues. The quantitative discrepancy observable between the total optical units liberated from the formaldehyde and the Carnoy-fixed material, as obvious in the Figure, has been shown to be caused by the extraction of acid soluble nucleotides by the formaldehyde fixative, and has been analyzed elsewhere[3].

For the identification of the absorbing substances in the McIlvaine-buffer-extract, use has been made of paper chromatographic analyses. The extracts were mixed with the equal volume 2 *N* HCl, and hydrolyzed for 1 h at 100°C. The products were adsorbed on charcoal, washed with water on the filter, and eluted with 50% ethanol, containing 2% NH_3. After concentration to a small volume *in vacuo*, spots were placed on Whatman No. 1 filter paper, and developed with the *iso*-propanol/HCl/H_2O solvent (97:25:28). The ultraviolet-prints, with a sample of protein-free yeast nucleic acid (Schwartz, purified according to Vischer[4]), dissolved in McIlvaine's buffer, and treated in the same way as the test samples, as a reference, showed the presence of guanine, adenine, cytidylic acid and uridylic acid in the hydrolysate from the buffer extract of Carnoy-fixed sections. Much fainter (especially for guanine and adenine), spots indicated their presence in the extract from the formaldehydetreated sections. The spots were cut out and identified spectrophotometrically, dissolved in 0·1 *N* HCl. No traces of thymine could be detected.

Discussion.—The findings show that Carnoy-fixed sections in McIlvaine's buffer will release all nucleotides digestible with RNase and/or extractable with perchloric acid. No admixture of proteins could be quoted. From these points of view, no objections could be raised against the use of Carnoy-fixed tissues for the histochemical RNase test. The completeness of the extraction by the buffer solution might presumingly be due to the formation of dialyzable degradation products from the RNA. Such a degradation could be accomplished in at least three ways: (1) RNA is hydrolyzed through the action of the acid fixative; this would not be in accordance with the experiences from nerve cells[5]. (2) Electrolytes have been shown to degrade un-fixed (from the histological point of view) RNA[6]. (3) RNase-activity might be present in the sections, and, after addition of the buffer, initiate conditions equivalent to those during the histochemical RNase digestion. Further experiments must be made to decide between these possibilities.

The assumption that formaldehyde-fixed sections do not lose RNA due to the action of the buffer seems doubtful, since about 20% of the total RNase-digestible material has been found in the buffer extract. It is very probable that this fraction is derived from RNA, since formaldehyde solutions will extract the acid soluble nucleotides[3], thus leaving only RNA as a source for the absorbing substances observed. Prolonged extraction will not increase the yield of nucleotides. Since the RNA in the sections is fully accessible to RNase digestion, none of the original RNase activity seems to be left after formaldehyde-fixation.

S. Lagerstedt

Department of Histology, University of Lund, Sweden, August 1, 1956.

Zusammenfassung

Aus den Befunden geht hervor, dass mit dem Puffergemisch von McIlvaine Ribonukleinsäure und säurelöslichen Nukleotide auch bei Abwesenheit von Ribonuklease aus Carnoy-fixiertem Gewebe vollständig herausgelöst werden, und zwar wahrscheinlich ohne Beimischung anderer für die Ribonukleasereaktion nichtspezifischer Substanzen. Nach Fixierung in Formaldehyd geht nur $^1/_5$ der ultraviolettabsorbierenden Substanzen in das Puffergemisch über.

[3] J. P. Greenstein, C. E. Carter, and H. W. Chalkley, Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. *12*, 64 (1947).

[4] E. Vischer and E. Chargaff, J. biol. Chem. *176*, 715 (1948).

[5] J.-E. Edström, Biochem. biophys. Acta *12*, 361 (1953).

17-Hydroxycorticosteroids in Human Milk

The aim of the present investigation has been to determine the level of 17-hydroxycorticosteroids in human milk, and also the ability of cortisone or hydrocortisone administration to elevate this level. The elucidation of this point is of pediatric significance in cases when the illness of the nursing mother (e.g., rheumatic fever or rheumatoid arthritis[1]) necessitates the administration of glucocorticoids.

The determinations have been extended to refer also to the glucuronic acid conjugated forms of 17-hydroxycorticosteroids.

Material. The specimens of human milk were collected from eight healthy mothers on the second or third day after delivery, at the following times: (1) 8 a.m. (2) 2 p.m. (3) 8 a.m. the next day. Immediately after the taking of the first specimen a single intramuscular injection of 100 mg cortisone acetate was given to four mothers. The remaining group of four mothers received a corresponding injection of 100 mg hydrocortisone acetate.

Method. The fresh samples of human milk were centrifuged (r.p.m. 8500, temp. +5°C). Aliquots of 5 cm^3 were taken from the clear bottom layer for the estimation of the 17-hydroxycorticosteroids. The free

[1] M. Oka, Ann. Rheum. Dis. *12*, 227 (1953).

17-hydroxycorticosteroids were determined by following the method of SILBER and PORTER[2] as modified by PETERSON[3]. After the extraction, the supernatant was saved for the determination of the conjugated forms. 1 cm³ of 2 *M* phosphate buffer pH 6·2 and 400 units of bacterial β-glucuronidase (Σ) were added. The re-extraction was performed after 48-h incubation at + 37° C.

Recovery of added hydrocortisone from human milk

Amount of added hydrocortisone (γ/5 cm³)	Recovery %
½	83
½	87
1	87
1	92
2	89
2	87

The suitability of the method for the estimation of 17-hydroxycorticosteroids from milk was checked by a recovery study of added hydrocortisone (Table).

Results. The values of the *free* 17-hydroxycorticosteroids before the administration of cortisone or hydrocortisone acetate ranged from 0 to 2·6 γ% in the eight cases studied. These concentrations are so low that the accuracy of the method used is no longer reliable. The single intramuscular injection of 100 mg hydrocortisone acetate produced a very slight elevation in the PORTER-SILBER reacting material. 6 h after the injection the values ranged from 2·2 to 4·7 γ%, and after 24 h from 1·5 to 3·0 γ%. The increase in the PORTER-SILBER reacting material after the injection of cortisone acetate was [illegible].

The level of the *conjugated* 17-hydroxycorticosteroids in the eight human milks studied ranged from 0·2 to 3·4 γ%. The single intramuscular injection of 100 mg cortisone or hydrocortisone acetate produced a slight elevation in the values of the conjugated 17-hydrocorticosteroids only in three instances in the samples drawn 6 h after the injection. All the values were near zero 24 h after the injections.

M. OKA, O. WASZ-HÖCKERT, and O. WIDHOLM

Kivelä Hospital and The Womens Clinic of the University of Helsinki, July 8, 1956.

Zusammenfassung

Der Gehalt an freiem und gebundenem 17-Hydroxycorticosteroid wurde an 8 Muttermilchentnahmen nach einer Modifikation der Methode von SILBER und PORTER geprüft. Der erhaltene Wert war nichtsignifikant niedrig. Auf einmalige intramuskuläre Injektion von 100 mg Cortison oder Hydrocortison erfolgte eine leichte Steigerung der Werte.

[2] R. H. SILBER and C. C. PORTER, J. biol. Chem. *210*, 923 (1954).
[3] R. E. PETERSON, J. B. WYNGAARDEN, S. L. GUERRA, B. B. BROWN, and J. J. BUNIM, J. clin. Invest. *34*, 1779 (1955).

The Effect of LSD-25 upon the Cerebral Blood Flow and EEG in Cats

The object of the present study was to determine whether LSD-25 (*d*-lysergic acid diethylamide[1]) has any effects upon the cerebral blood flow, the EEG and the blood pressure in anaesthetized and non-anaesthetized (*encéphale isolé*) cats. In recent experimental studies[2], a sympathomimetic action of LSD-25 in man and experimental animals has been reported. PURPURA[3] has analyzed the effects of LSD-25 upon cortical electrical activity. Recently, SOKOLOFF *et al.*[4] found no changes from LSD-25 in cerebral blood flow, vascular resistance, oxygen consumption, glucose utilization or respiratory quotient in man (normals and schizophrenics). The present experiments have been performed with the method of INGVAR and SÖDERBERG[5] which provides a continuous registration of the cerebral blood flow with a high degree of accuracy.

In cats under pentothal or of the *encéphale isolé*-type, the venous outflow from the cannulated superior sagittal sinus was continuously measured with an electrical drop counter. Anastomoses between diploic veins and the sinus were interrupted by a longitudinal craniotomy. The bony defect was filled with dental acrylate cement. EEG was recorded from rostral and parietal parts of the cortex.

Injected intravenously, LSD-25 in doses of up to 10 μg/kg had no effects upon the functions studied. In larger doses up to 100 μg/kg, however, a small transient cerebral vasoconstriction was observed which coincided with a transient 'activation' of the EEG. Sometimes a small cutaneous vasoconstriction was also noted[6].

Injections into the carotid artery of LSD-25 were also carried out in doses of up to 50 μg/kg. It was then observed that the EEG effects were very pronounced in the homolateral hemisphere. Figure 1 shows a successful example in which 100 μg of LSD-25 were injected into the right carotid artery (*encéphale isolé*-preparation). There was an immediate transient effect of the 'activation' type in both leads from the right hemisphere which, however, was soon followed by a general reduction of the amplitude, an increase in the numbers of spindles and – bilaterally – a generalized decrease in frequency. In about 4 min, the EEG changes had almost disappeared, but a right-sided reduction of the amplitude was still retained.

The flow record shows an immediate vasodilatation followed by a long period during which the flow was practically unchanged in spite of the fact that the blood pressure gradually increased about 30 mm Hg in 5 min. This is interpreted as due to a vasoconstriction in the cerebral vessels. A long-lasting increase of the cerebral vascular resistance was, in fact, the most characteristic effect of LSD-25 seen in the experiments.

In Figure 2 (*encéphale isolé*) another example is given of the effects of 100 μg LSD-25 into the left carotid

[1] W. A. STOLL and A. HOFMANN, Helv. chim. Acta *26*, 944 (1943). – W. A. STOLL, Arch. Neurol. Psychiat. *60*, 279 (1947). – LSD-25 was kindly provided by Sandoz AG., Basel.
[2] E. ROTHLIN, A. CERLETTI, H. KOSZETT, W. R. SCHALCH, and M. TAESCHLER, Exper. *12*, 154 (1956).
[3] D. P. PURPURA, Arch. Neurol. Psychiat. *75*, 122 (1956); *75*, 132 (1956).
[4] L. SOKOLOFF, S. PERLIS, C. KORNETSKY, and S. S. KETY, Fed. Proc. *15*, 174 (1956).
[5] D. H. INGVAR and U. SÖDERBERG, Nature *177*, 339 (1956); EEG Neurophysiol. *8*, 402 (1956); to be published.
[6] *Cf.* A. HORITA and J. M. DILLE, Science *120*, 1100 (1954).

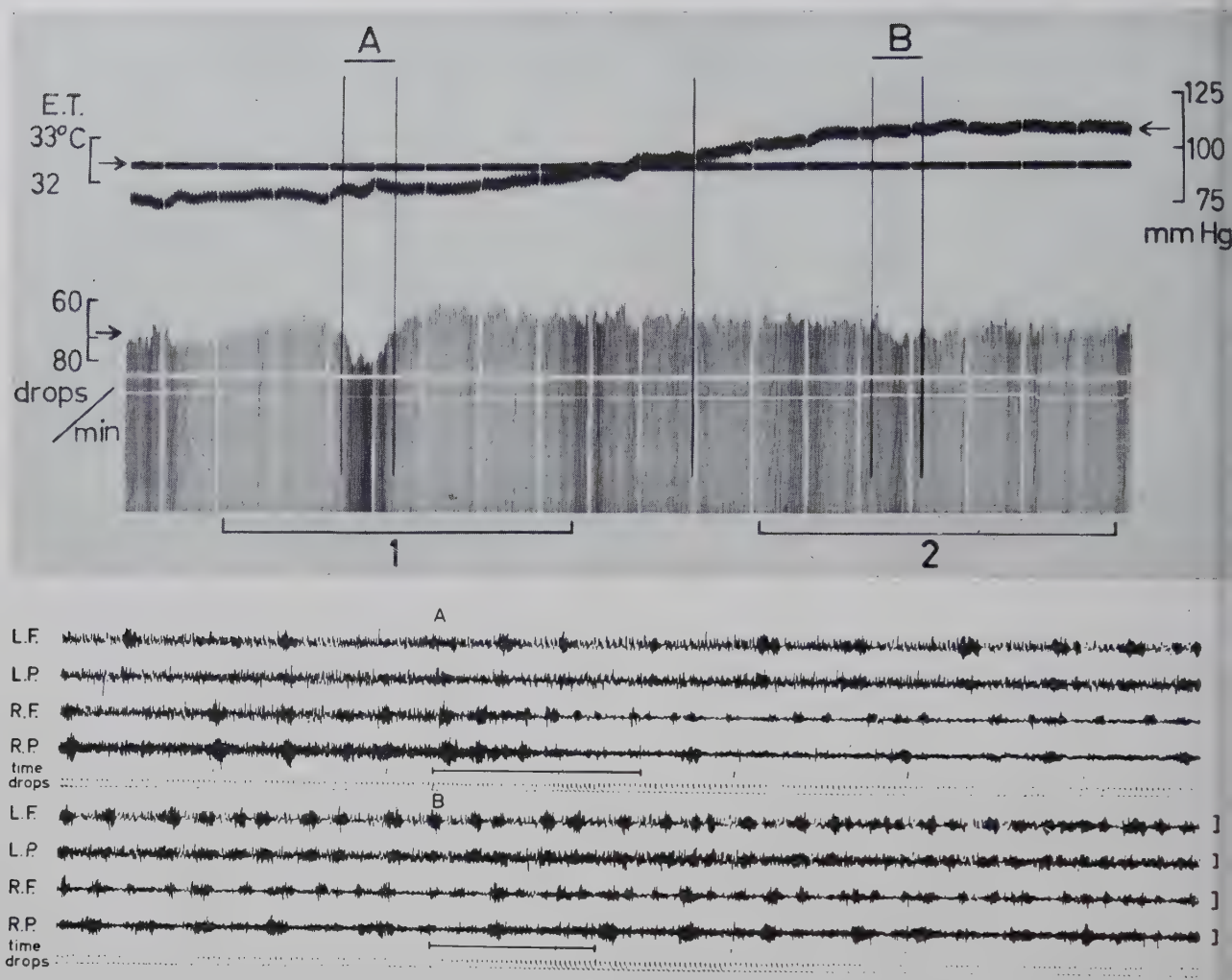


Fig. 1.—Cat, *encéphale isolé*-preparation. *Upper diagram*: Records of ear temperature, blood pressure and cerebral blood flow. Interruptions of diagram every 30 s. Height of vertical lines in flow record is proportional to time interval between blood drops from the cannulated superior sagittal sinus. Thus, a curve joining upper ends of the vertical lines demonstrates variations in cerebral blood flow. *Lower diagram:* Bipolar EEG leads on left frontal (*L.F.*), left parietal (*L.P.*), right frontal (*R.F.*) and right parietal (*R.P.*) parts of the cortex. EEG samples from periods marked 1 and 2 in upper diagram. *A* Injection into right carotid artery of 100 μg of LSD-25 in 1 ml solution. Note initial transient vasodilatation followed by a period with increasing blood pressure with almost constant cerebral blood flow, indicating vasoconstriction. EEG records demonstrate initial unilateral effects with depression. In sample 2 bilateral EEG effects with increase in number of spindles. *B:* Control injection into carotid artery of 1 ml Ringer solution.

artery. There was a marked ipsilateral activation period in the EEG while the spindle pattern of the opposite hemisphere remained almost unifluenced. In this case there were no significant changes in the cerebral blood flow.

In deeply anaesthetized preparations LSD-25 did not change the EEG or the cerebral blood flow even in doses of up to 100 μg/kg given intravenously or into the carotid artery.

The present results have confirmed the findings of Sokoloff *et al.*[4] that doses comparable to those with clinical effects (4 μg/kg body weight) have no observable effects upon the EEG. Larger doses were, however, found in the present investigation to exert an evident effect upon the cerebral blood flow as well as upon the EEG and systemic circulation. From the results obtained after injection into the carotid artery, it may be reasonable to assume that an important part of the action of LSD-25 is exerted directly upon the cortex, since a brain stem action would have given bilateral effects[7]. Moruzzi and Magoun[8], however, observed that unilateral electrical stimulation of the reticular activating system of the brain stem may sometimes give desynchronization in the homolateral hemisphere only.

The EEG effects found are in general agreement with the electrophysiological findings of Purpura[3], who demonstrated a facilitatory action of smaller doses and a depressant action of larger doses upon certain central synaptic events.

D. H. Ingvar and U. Söderberg

Nobel Institute for Neurophysiology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, August 13, 1956.

[7] *Cf.* K. Shimizu, S. Refsum, and F. A. Gibbs, EEG Clin. Neurophysiol. *4*, 141 (1952).

[8] G. Moruzzi and H. W. Magoun, EEG Clin. Neurophysiol. *1*, 455 (1949).

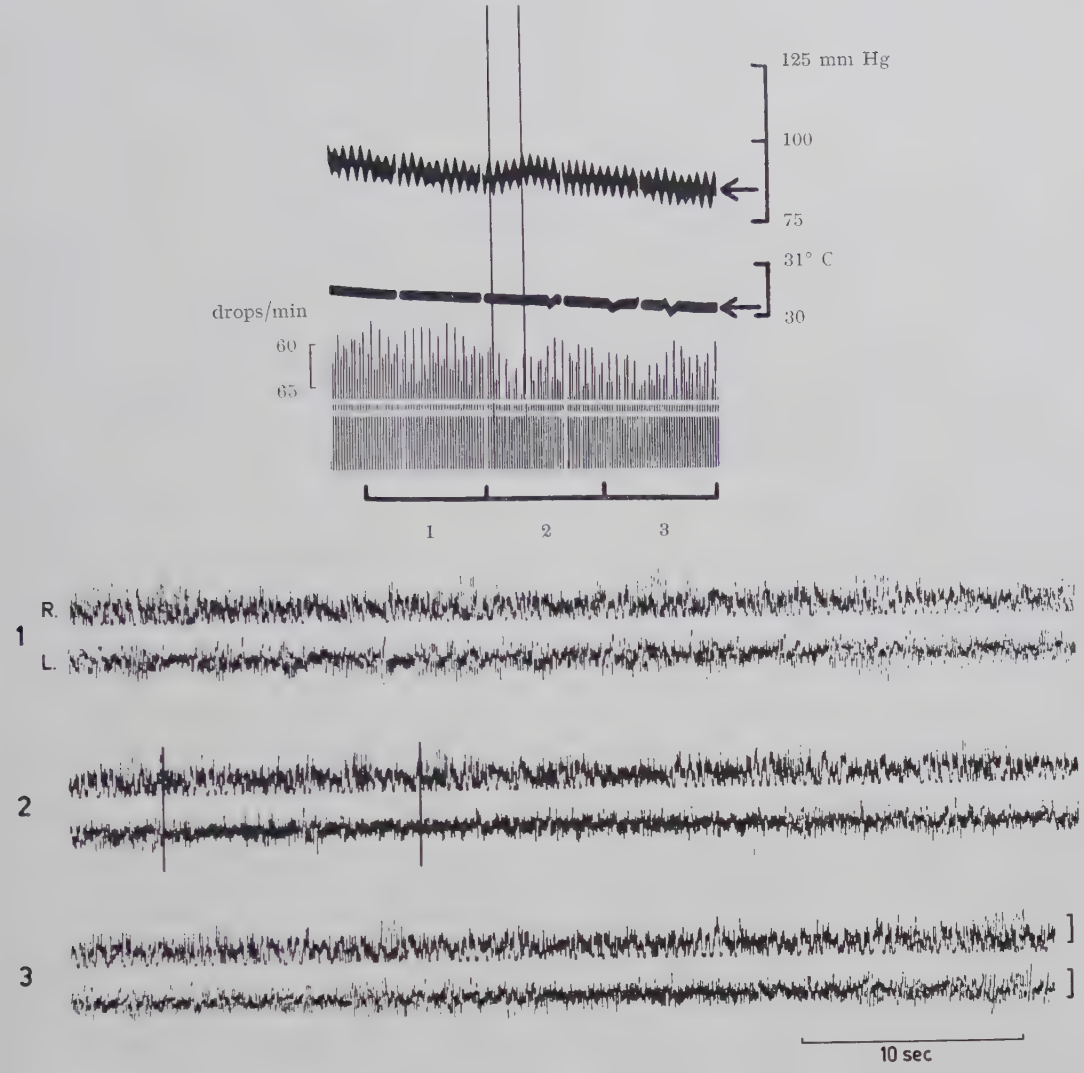


Fig. 2.—Cat, *encéphale isolé* preparation. *Upper diagram:* Blood pressure, ear skin temperature and cerebral blood flow (*Cf.* Fig. 1). *Lower diagram:* EEG tracings from right (*R*) and left (*L*) cruciate region during periods marked 1 to 3 below upper diagram. Between two vertical lines injection of 40 μg/kg of LSD-25 into the left carotid artery. Note activation pattern in EEG-record from left hemisphere.

Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, dass LSD-25 (*d*-Lysergsäure-diäthylamid) in Dosen von 30 bis 100 γ/kg Körpergewicht bei der nichtnarkotisierten Katze (*encéphale isolé*) meistens eine Erhöhung des zerebralen Gefässwiderstandes herbeiführte. In die Carotis injiziert, gab LSD-25 in denselben Dosen nach vorübergehender, halbseitiger Aktivierung eine Depression des Elektroenzephalogrammes. Kleinere Dosen gaben im EEG eine Aktivierung oder waren ohne Wirkung.

Relationship Between Methionine and Aromatic Amino Acids in *Escherichia Coli*

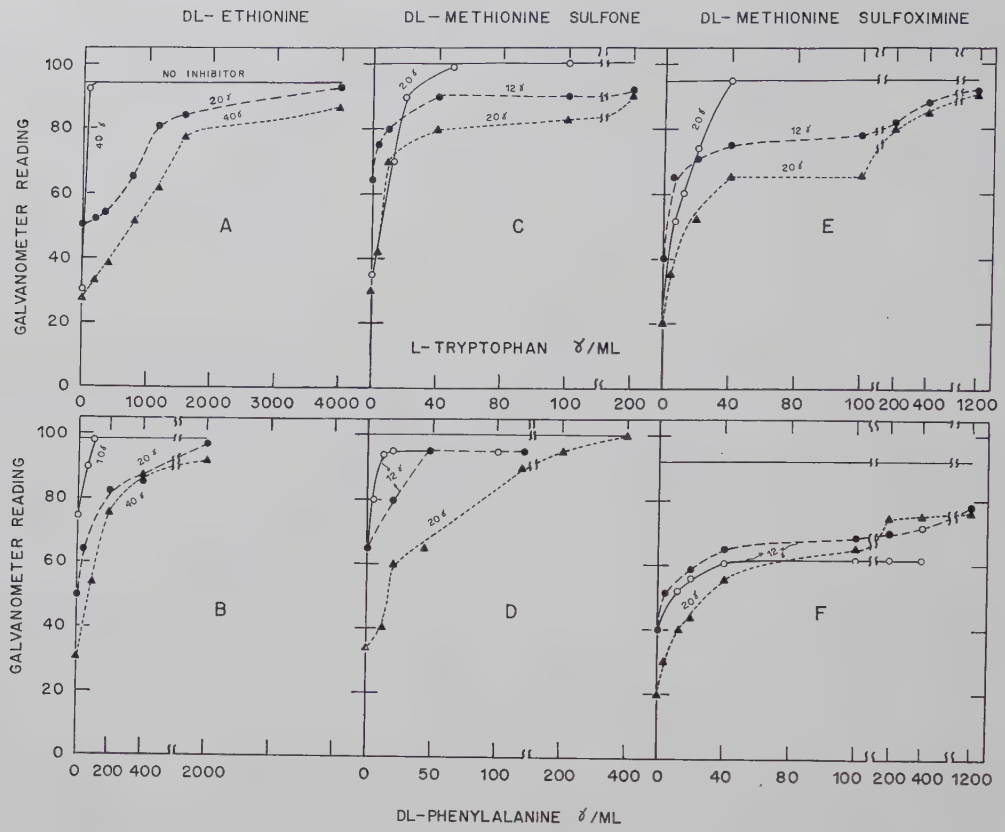
It was previously reported from this laboratory[1] that the inhibition of *Escherichia coli* by chloromycetin, aureomycin, terramycin and 5-fluorotryptophan, could be alleviated, within limits, by methionine, and by tryptophan, phenylalanine and tyrosine. This appeared to indicate that there is a relationship between the aromatic amino acids and methionine. To confirm this relationship, the problem was approached from the opposite angle, i.e., to see whether the aromatic amino acids play a role in the metabolism of methionine.

On the basis of extensive work carried out in recent years, it has generally been considered that the methionine analogues, ethionine, methionine sulfone, methionine sulfoximine and methoxinine are specific antagonists of methionine metabolism both in bacteria and animals (for a general review see [2]).

The present work with *E. coli* shows, however, that the inhibition caused by the antimetabolites of methionine can be reversed not only by methionine, but by tryptophan, phenylalanine and somewhat by tyrosine

[1] E. D. Bergmann, S. Sicher, and B. E. Volcani, Bull. Res. Council Israel *4*, 19 (1954).

[2] G. J. Martin, *Biological Antagonism* (The Blakiston Co. Inc., New York 1951), p. 118.



Reversal of DL-ethionine, DL-methionine sulfone and DL-methionine sulfoximine inhibition of the growth of *E. coli* by DL-methionine, L-tryptophan, DL-phenylalanine and L-tyrosine. Incubated 17–20 h at 37° C. The figures above the curve represent γ/ml of the inhibitor. *A, C, E* ○——○ methionine; other curves tryptophan. *B, D, F* ○——○ tyrosine; other curves phenylalanine.

as well. This substantiates our previous results. The interpretation, however, of this relationship is still obscure.

Inhibition analyses were carried out with *E. coli* (ATCC 9637) in a basal medium[3] as previously described[4]. The various sterile, glass-filtered, inhibitors were added aseptically to the autoclaved medium. Cultures were incubated at 37° C for 17 to 20 h, and growth turbidity was measured with the Klett-Summerson photoelectric colorimeter using a No. 64 red filter. All experiments were carried out in duplicate.

The inhibitory concentrations of the various compounds and the amounts of the amino acids required to reverse the inhibition were determined from dose-response curves. The antibacterial indices (γ/ml of inhibitor *versus* γ/ml of metabolite) for different levels of inhibition were obtained from the corresponding growth curves.

DL-ethionine was obtained from Bios Laboratories, Inc.; DL-methionine sulfone, DL-methionine sulfoximine and DL-methionine sulfoxide were products of California Foundation for Biochemical Research. DL-methoxinine was a gift from Dr. J. P. English.

As shown in the Figure the inhibition caused by ethionine, methionine sulfone, and methionine sulfoximine is reversed, by methionine, L-tryptophan or DL-phenylalanine; methionine was most effective. The reversal by tyrosine was confined to the lower inhibitory levels; e.g., with ethionine, above 75% of full growth, with methionine sulfone above 65% growth (in this case it was equally as active as methionine) and with methionine sulfoximine, tyrosine alleviated the inhibition only by 20% in all the inhibitory levels regardless of tyrosine concentration. The antibacterial indices are given in the Table.

Antibacterial indices of *E. coli* inhibited by DL-ethionine, DL-methionine sulfone or DL-methionine sulfoximine, reversed by DL-methionine, L-tryptophan and DL-phenylalanine.

Antagonist	γ/ml	% Full growth	Antibacterial indices at 50% growth		
			DL-Methionine	L-Tryptophan	DL-Phenylalanine
DL-Ethionine	40	30	80	0·05	0·4
	200	20	166	0·10	0·2
DL-Methionine sulfone	12	65	4·8*	6*	2·4*
	20	35	1·5*	2*	0·3*
DL-Methionine sulfoximine	12	40	0·3	3	3·0
	16	30	0·8	2	1·6

* At 70% full growth.

With DL-methoxinine, the complete inhibition (800 γ/ml) was reversed to full growth by L-tryptophan (2000 γ/ml) or DL-phenylalanine (2000 γ/ml). The effect of tyrosine was not tested, because only a small amount of methoxinine was available.

[3] B. D. Davis and E. S. Mingioli, J. Bacteriol. *60*, 17 (1950).
[4] B. E. Volcani, S. Sicher, E. D. Bergmann, and H. Bendas, J. biol. Chem. *207*, 411 (1954).

The inhibition caused by DL-methionine sulfoxide, an antimetabolite of glutamic acid in *L. arabinousus*[5], is not counteracted even at 75% of full growth (10 γ/ml) by methionine (400 γ/ml), L-tryptophan or DL-phenylalanine (4000 γ/ml).

These results led Dr. M. FELDMAN of this Institute, to study the effect of tryptophan on the inhibitory action of ethionine during chick morphogenesis, full details of which will be published elsewhere. It has previously been shown[6] that ethionine shows two types of inhibitory effects: (1) it retards the rate of differentiation of the embryo; (2) it causes malformation, mainly of the neural tissue. In the present study it was found that methionine overcomes, almost completely, both effects; L-tryptophan however, showed very little effect on ethionine-malformation, but abolished to a great extent the retarded differentiation. This indicates that the two processes are related to different amino acids metabolism.

In the light of these experiments, it is important to determine whether the relation between methionine and the aromatic amino acids exists in mammalia also. If it does, then effects which have been attributed to methionine inhibition alone must be re-examined to see whether the aromatic amino acids are involved as well.

We are greatly indebted to Dr. M. FELDMAN for permission to describe his results prior to publication, and to Dr. J. P. ENGLISH for the DL-methoxinine.

B. E. VOLCANI and S. SARID

The Weizmann Institute of Science, Rehovoth, Israel, April 15, 1956.

Zusammenfassung

Wachstumshemmung von *Escherichia coli*, durch Äthionin, Methioninsulfon, Methioninsulfoximin und Methoxinin verursacht, wird neben Methionin auch durch Tryptophan, Phenylalanin und in gewissem Umfang durch Tyrosin aufgehoben, was auf einen Zusammenhang im Stoffwechsel von Methionin und den aromatischen Aminosäuren hinweist.

[5] H. WAELSCH, P. OWADES, H. K. MILLER, and E. BOREK, J. biol. Chem. *166*, 273 (1946).

[6] M. FELDMAN and C. H. WADDINGTON, J. Embryol. exp. Morphol. *3*, 44 (1955).

The Apparent Expansion of the Inulin Space in the Nephrectomized Dog

As has been reported by GAUDINO *et al.*[1], in man and in the dog inulin given by the constant infusion technique is distributed evenly throughout the total extracellular space, is not metabolized in the organism, does not enter the intracellular space and is eliminated completely and exculsively through the kidneys. GAUDINO and LEVITT[2], as well as RAISZ *et al.*[3], have reported that in the dog the apparent inulin space expands after nephrectomy. FINKENSTAEDT *et al.*[4], HAMBURGER and MATHÉ[5], and also EPSTEIN *et al.*[6], have stated recently that in the nephrectomized dog and anuric man alike, the plasma concentration after a single injection of inulin decreased steadily, simulating thereby an expansion of extracellular space. Other possible explanations are: uptake of inulin by cells ,breakdown in the organism or elimination through some extrarenal route.

We have studied the apparent inulin space in nephrectomized dogs. Immediately after nephrectomy a single injection of inulin was administered and its level in plasma was determined daily until the animal died. The inulin preparation used was nearly 100 per cent yeast-resistant and about 90 per cent alkali-resistant. The solution injected and each daily sample of plasma were analysed partly after treatment with yeast, according to HARRISON[7], and partly after heating in the presence of alkali as described by LITTLE[8]. By dividing the injected quantity of inulin by plasma concentration, the apparent inulin space is calculated and is expressed as percentage of preoperative body weight. The means of our data are tabulated (with standard error and number of cases). As can be seen, the apparent distribution space continues to expand until spontaneous death occurs. (Statistical analysis was computed by FISHER's *t*-test[9].) There is no difference in distribution between the yeast-resistant and alkali-resistant inulins.

In an attempt to decide whether we are dealing with a real expansion of the extracellular space, after-loading experiments were carried out. Two techniques were used: in one group inulin was injected immediately after nephrectomy and at 3 to 5 days distribution was determined after injecting an other dose. In the other group the first dose of inulin was administered at 3 to 5 days following nephrectomy. As the two types of after-loading yielded comparable results, the means for both groups are presented together. In the after-loading experiments, the inulin space value corresponds with that for days 1 and 2 and is significantly smaller than the inulin space for the corresponding day, as determined on the basis of inulin injected on day 1.

Thus, in our experiments the true extracellular space did not increase in the nephrectomized dog and the apparent expansion of the inulin space (i.e. decrease in plasma concentration) was due either to a metabolisation or/and to an extrarenal elimination or/and to cellular storage of inulin. Since JANCSÓ[10] succeeded in demonstrating by histological methods cellular storage of inulin in reticuloendotholial cells of connective tissue and liver of mice, the latter possibility seems to be the most likely.

A detailed account of our data is to be published in Acta Physiologica Hungarica.

P. BÁLINT and I. FORGÁCS

Physiological Institute of the Medical University, Budapest, July 25, 1956.

[1] M. GAUDINO, I. L. SCHWARTZ, and M. F. LEVITT, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *68*, 507 (1948). – M. GAUDINO and M. F. LEVITT, Amer. J. Physiol. *157*, 387 (1949).

[2] M. GAUDINO and M. F. LEVITT, Amer. J. Physiol. *157*, 387 (1949).

[3] L. G. RAISZ, M. K. YOUNG, and I. T. STINSON, Amer. J. Physiol. *174*, 72 (1953).

[4] J. T. FINKENSTAEDT, M. P. O'MEARA, and J. P. MERRILL, J. clin. Invest. *32*, 209 (1953).

[5] J. HAMBURGER and G. MATHÉ, *Fluid Balance in Anuria*, in *The Kidney*, Ciba Symposium (Churchill, London 1954), p. 288.

[6] F. H. EPSTEIN, C. R. KLEEMAN, M. E. RUBINI, and E. LANDIN, Amer. J. Physiol. *182*, 553 (1955).

[7] H. E. HARRISON, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *49*, 109 (1942).

[8] J. M. LITTLE, J. biol. Chem. *180*, 747 (1949).

[9] P. A. FISHER, *Statistical Methods for Research Workers*, 10th ed. (Oliver and Boyd, London 1946).

[10] N. JANCSÓ, *Speicherung* (Akadémiai Kiadó, Budapest 1955).

	1th day	2nd day	3rd day	4th day	5th day
Inulin space (yeast-resistant)	$17{\cdot}7 \pm 3{\cdot}2$ $n = 18$	$22{\cdot}6 \pm 4{\cdot}1$ $n = 18$	$27{\cdot}0 \pm 4{\cdot}7$ $n = 15$	$33{\cdot}2 \pm 4{\cdot}9$ $n = 8$	$38{\cdot}0 \pm 8{\cdot}8$ $n = 3$
P	$< 0{\cdot}001$	$< 0{\cdot}01$	$< 0{\cdot}02$	$> 0{\cdot}05$	
Inulin space (alkali-resistant)	$17{\cdot}2 \pm 2{\cdot}1$ $n = 19$	$23{\cdot}4 \pm 4{\cdot}2$ $n = 19$	$27{\cdot}8 \pm 5{\cdot}3$ $n = 15$	$36{\cdot}9 \pm 11{\cdot}4$ $n = 7$	$41{\cdot}1 \pm 11{\cdot}7$ $n = 4$
P	$< 0{\cdot}001$	$< 0{\cdot}01$	$< 0{\cdot}05$	$> 0{\cdot}05$	
Inulin space after-loaded (yeast-resistant)	–	–	$19{\cdot}6 \pm 2{\cdot}6$ $n = 7$	$19{\cdot}7 \pm 1{\cdot}5$ $n = 5$	23·3 $n = 2$
P			$< 0{\cdot}01$[1] $> 0{\cdot}05$[2]	$< 0{\cdot}001$[1] $> 0{\cdot}05$[2]	
Inulin space after-loaded (alkali-resistant)	–	–	$17{\cdot}5 \pm 2{\cdot}5$ $n = 8$	$20{\cdot}2 \pm 4{\cdot}5$ $n = 5$	20·0 $n = 1$
P			$< 0{\cdot}01$[1] $> 0{\cdot}05$[2]	$< 0{\cdot}02$[1] $> 0{\cdot}05$[2]	

[1] Against non-after-loaded series of the same day.

[2] Against non-after-loaded series of the first day.

Zusammenfassung

Der Verteilungsraum des Inulins beim nephrektomierten Hund am Operationstag wurde bei 17% des Körpergewichts gefunden. In den nächsten Tagen verminderte sich die Seruminulinkonzentration fortlaufend, unter scheinbarer Vergrösserung des Verteilungsraumes. Am 3. bis 5. Tag wurden einige Tiere erneut oder zum ersten Mal mit Inulin belastet, und es konnte festgestellt werden, dass keine wirkliche Vergrösserung des Verteilungsraumes eintritt. Für die Verminderung der Serumkonzentration wird auf Grund von Jancós Untersuchungen eine intrazelluläre Speicherung als wahrscheinlich angenommen.

Co-enzyme A Content in the American Cockroach (*Periplaneta americana* L.) and the Housefly (*Musca domestica* L.)

In view of the importance assumed in the last few years by CoA as regulator of many metabolic mechanisms[1], and also in relation with earlier work by the present authors[2] on the insecticidal action of iodo-, bromo-, and chloroacetic acids (halogen-containing alkylating agents), whose toxic action develops by the alkylation of –SH groups (CoA contains an –SH group, to which its activity is closely bound), it was decided to estimate this co-enzyme in insects.

Adult males of the American cockroach (*Periplaneta americana*) and adult females of the housefly (*Musca domestica*) were used as biological material. CoA estimation was carried out as follows: 1 g of material is kept in the bottom of a test tube in a boiling water bath for 10 min, and then transferred to a cooled glass mortar at 0° and ground up with quartz sand after addition of 5 ml of iced water. The extract is left at 0° for 15 min and then centrifuged in a refrigerated centrifuge. 0·5 ml of extract prepared in this way are estimated for CoA by the 'acetylation of sulfanilamide' method, as reported by Novelli[3].

Some of the coxal muscles (red muscles) of *P. americana* contain considerably higher quantitities of succinic dehydrogenase than other muscles (white muscles) also of the coxa, as the authors have previously shown[4]; furthermore, like succinic dehydrogenase, CoA is bound to the oxidative metabolism of carbohydrates. For these reasons, it was also decided to look for differences in the CoA content of the two types of muscle. The nomenclature of the muscles tested is reported in an earlier paper[4].

Table I.—CoA content in units/g of fresh material (*P. americana*)

Whole coxae	White coxal muscles	Red coxal muscles
11·4	6·1	28·0

It may be seen from Table I that the CoA content of the white coxal muscles is about $^1/_5$ that of the red coxal muscles. This finding, and the fact that the red muscles contain considerably larger quantities of succinic dehydrogenase and cytochrome[5] than the white muscles, together confirm the hypothesis that the oxidative metabolic functions are more developed in the red muscles.

In *M. domestica*, practically equal values were obtained by estimation of CoA in the whole insect and the thorax alone. The curve of CoA content against age was also studied in whole flies.

Table II.—CoA content in units/g of fresh material (whole flies) against age in *M. domestica*

Age in days	1	3	6	9	12
CoA content	2·3	5·1	5·5	7·7	6·5

It will be seen from Table II that the CoA content in *M. domestica* increases with age up to the 9th day. A similar curve had already been met with for the increase in the average diameter of the muscle sarcosomes of the

[1] G. Fornaini and E. Marinello, Giorn. Biochim. *3*, 97 (1954).

[2] S. Bettini and M. Boccacci, Riv. Parass. *13*, 165 (1952); R. C. Ist. Sup. Sanità *17*, 188 (1954); Riv. Parass. *16*, 13 (1955). – S. Bettini, M. Boccacci, and C. Rossi, Riv. Parass. *16*, 103 (1955).

[3] D. Novelli, in *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. II (Interscience Publishers, New York 1955), p. 201.

[4] S. Bettini and M. Boccacci, R. C. Ist. Sup. Sanità *17*, 188 (1954).

[5] V. B. Wigglesworth, *The Principles of Insect Physiology* (Methuen, 1950), p. 410.

thorax in *Drosophila funebris* with age by WATANABE and WILLIAMS[6]. In view of HIGGINS *et al.*'s demonstration[7] that in rat liver CoA is mostly contained in the mitochondria, the present data and those of WATANABE and WILLIAMS may together indicate indirectly that CoA is also chiefly localized in the sarcosomes in insects.

M. BOCCACCI and S. BETTINI

Department of Parasitology, Istituto Superiore di Sanità, Roma, July 4, 1956.

Riassunto

Gli autori hanno dosato il CoA nei muscoli della coxa di *Periplaneta americana* ed in *Musca domestica* in toto. Vengono messe in evidenza le differenze del contenuto in CoA dei muscoli bianchi e rossi della coxa di blatta. Viene inoltre messo in evidenza l'aumento progressivo del CoA, durante i primi 9 giorni di vita dell'adulto, in *M. domestica*.

[6] M. I. WATANABE and C. M. WILLIAMS, J. Gen. Physiol. *37*, 71 (1953).

[7] H. HIGGINS, J. A. MILLER, J. M. PRICE, and F. M. STRONG, Proc. roy. Soc. exp. Biol. Med. *75*, 462 (1950).

Über den Einfluss von Organextrakten auf den Sauerstoffverbrauch von Geweben

Untersuchungen an Leber- und Herzschnitten gesunder und skorbutkranker Meerschweinchen

Wir untersuchten den O_2-Verbrauch von Herz- und Leberschnitten gesunder und skorbutkranker Meerschweinchen und seine Veränderungen durch den Zusatz von Organextrakten. Als solche verwendeten wir den Gesamtherzextrakt «Recosen» und den Leberextrakt «Ripason».

Die Ergebnisse klinischer Untersuchungen mit diesen Extrakten haben ihre therapeutische Verwendung bestimmt. Die Schaffung experimenteller Grundlagen begegnet verschiedenen Schwierigkeiten, vor allem wenn solche Untersuchungen einer experimentellen Sicherung der klinischen Erfahrung dienen sollen, dass Extrakte bestimmter Organe besonders auf jene Organe wirken, aus denen sie gewonnen wurden. Zur Abklärung dieser Frage soll die folgende Mitteilung beitragen.

Methodik. Die Bestimmung des O_2-Verbrauches wurde in der Warburg-Apparatur unter Verwendung von Krebs-Ringer-Lösung durchgeführt. In den Gefässen befand sich ein Gesamtvolumen von 2 ml. Es wurden dünnste Rasiermesserschnitte aus Herz und Leber frisch getöteter Meerschweinchen verwendet. Die Zahl der Schnitte wurde so gewählt, dass das Gesamttrockengewicht des untersuchten Materials zwischen 4 und 8 mg lag. Der Skorbut wurde nach SHERMAN, LA MER und CAMPELL[1] erzeugt und die Tiere nach dem 20. Skorbutdiättag während des grössten Gewichtsabsturzes getötet. Zur Sicherung eines vorliegenden Skorbuts wurde der Vitamin-C-Gehalt der Nebennieren nach TILLMANNS[2] (Dichlorphenolindophenol-Titration) bestimmt. Dieser war bei allen verwendeten Skorbuttieren nahezu Null.

Die zur Untersuchung kommenden Organextrakte wurden so zugegeben, dass im Hauptraum eine Extraktkonzentration von 1:100 bestand.

In Voruntersuchungen wurde zunächst der Sauerstoffverbrauch von unbeeinflussten Herz- und Lebergeweben normaler und skorbutkranker Meerschweinchen ermittelt. Die Ergebnisse aus je 64 Bestimmungen an Gewebsschnitten von je 22 Versuchstieren zeigt die Tabelle I:

Tabelle I

O_2-Verbrauch (μl/mg Trockengewicht) von Meerschweinchengewebe

	nach 20 min	nach 40 min	nach 60 min
Herzgewebe			
Normaltiere	2,3	4,6	6,8
Skorbuttiere. . . .	2,6	5,1	7,4
Lebergewebe			
Normaltiere	3,9	7,4	10,5
Skorbuttiere. . . .	4,3	8,0	11,3

Es ist zu ersehen, dass sowohl Herz- als auch Lebergewebe skorbutkranker Meerschweinchen in der gleichen Zeit mehr Sauerstoff verbrauchen als die entsprechenden Gewebe gesunder Versuchstiere. Lebergewebe ist im Sauerstoffverbrauch erheblich aktiver als Herzgewebe. In allen Versuchen wird deutlich sichtbar, dass der Sauerstoffverbrauch stetig zunimmt, so dass eine lineare Beziehung zwischen Sauerstoffverbrauch und Zeit zustande kommt. Die Ergebnisse stimmen mit den Angaben von KREBS[3] über den Q O_2 bei Normaltieren überein.

Wir haben die Gewebe von Herz und Leber der beiden Tiergruppen in weiteren Versuchen von vornherein mit den beschriebenen wässrigen Organextrakten in Berührung gebracht und den Sauerstoffverbrauch in je 61 Messungen an 18 Geweben verschiedener Tiere für jeden Extrakt gemessen. Die Ergebnisse fasst die Tabelle II zusammen.

Tabelle II

Q O_2(O_2-Verbrauch in μl/mg Trockengewicht in 60 min)

	Herzgewebe		*Lebergewebe*	
	normal	Skorbut	normal	Skorbut
1. ohne Zusatz. . . .	6,8	7,4	10,5	11,3
2. mit Herzextrakt . .	8,4	10,0	12,0	12,8
3. mit Leberextrakt .	7,4	8,5	13,5	14,3
4. mit Magen-Dünndarm-Extrakt . . .	7,6	8,9	12,0	13,3

Das Resultat dieser Prüfung ist, dass alle von uns verwendeten Organextrakte den Sauerstoffverbrauch von Gewebsschnitten aus Herz und Leber sowohl gesunder als auch skorbutkranker Meerschweinchen steigern. Es fällt auf, dass die Atmung des Herzgewebes beider Tiergruppen besonders stark durch den Herzextrakt, und die Atmung des Lebergewebes ebenso durch den Leberextrakt gesteigert wird.

Wir haben die gesamten Messergebnisse einer statistischen Prüfung durch den Fischerschen *t*-Test unterzogen. Die Werte der Wahrscheinlichkeit *P*, die die Sicherheit eines Unterschiedes der Messergebnisse angeben, sind in Tabelle III zusammengefasst. Die Ver-

[1] H. C. SHERMAN, V. K. LA MER und H. L. CAMPBELL, J. Amer. chem. Soc. *44*, 165 (1922).

[2] J. TILLMANNS, Z. Lebensmittelforsch. *63*, 1 (1932).

[3] H. A. KREBS, Biochem. biophys. Acta *4*, 249 (1950).

hältniszahlen beziehen sich auf die in Tabelle II erwähnten Versuchsreihen. Es bedeutet zum Beispiel 1:2, dass die Gewebsatmung ohne Zusatz, mit der Atmung nach Herzextraktzusatz verglichen wird.

Tabelle III

Wahrscheinlichkeit P eines Unterschieds der Ergebnisse aus Tabelle II

Vergleich	*Herzgewebe*			*Lebergewebe*	
	normal P	Skorbut P		normal P	Skorbut P
1:2	*< 0,001*	*< 0,001*	1:2	< 0,05	< 0,05
1:3	< 0,1	< 0,1	1:3	*< 0,001*	*< 0,001*
1:4	< 0,05	< 0,05	1:4	< 0,05	< 0,02

Die Tabelle III legt klar, dass die höchste Wahrscheinlichkeit eines Unterschiedes der Messergebnisse (P 0,001) beim Sauerstoffverbrauch von Herzschnitten beider Versuchsgruppen nur vom Herzextrakt, bei den Leberschnitten nur vom Leberextrakt erreicht wird. Die Steigerung der Atmung durch die anderen Extrakte ist weniger gesichert.

G. Grupp und F. C. Roulet

Pharmakologisches Institut der Universität Freiburg i. Br. und Versuchsabteilung der Robapharm Laboratoriums AG., Basel, den 1. August 1956.

Résumé

1° La consommation en O_2 des tissus cardiaque et hépatique de cobayes sains et atteints de scorbut est augmentée par l'apport de différents extraits organiques (extraits de cœur, foie et estomac-i ntestin). L'extrait de cœur augmente fortement la respiration des coupes du muscle cardiaque et l'extrait de foie celles des coupes du foie (ceci est prouvé d'une manière significative par les statistiques).

2° La respiration de coupes de tissus de cobayes atteints de scorbut est plus forte que celle d'animaux d'expériences sains.

3° Ces résultats soulignent le fait que les extraits d'organes exercent une influence particulière sur les tissus dont ils proviennent.

Inhibition sélective des « vraies» et « pseudo»-cholinestérases du rectus de grenouille

On sait que les cholinestérases des muscles striés sont essentiellement représentées par des cholinestérases dites «vraies» (AcChE)[1].

Toutefois, il a été montré que le diaphragme de rat contient aussi un enzyme se comportant comme une pseudo-cholinestérase (XChE)[2].

Dans le cas du rectus de grenouille, plusieurs incertitudes subsistent. Cohen et Posthumus[3] ont montré que des extraits de ce muscle sont capables d'hydrolyser non seulement l'acétylcholine mais aussi la butyrylcholine, cette dernière très lentement; on ne sait cependant pas si ces hydrolyses sont réalisées par un seul enzyme ou par des estérases différentes. – D'autre part, dans une note antérieure[4] nous avons observé, avec des anticholinestérasiques sélectifs, des potentialisations préférentielles, tantôt de l'acétylcholine, tantôt de la butyrylcholine, mais des mécanismes de potentialisations non enzymatiques ont été invoqués, en particulier dans le cas de la butyrylcholine, par Cohen et Posthumus.

Dans ce travail nous avons recherché:

a) si les hydrolyses de l'acétylcholine et de la butyrylcholine pouvaient ou non être attribuées à des enzymes différents, et cela en déterminant leur sensibilité à divers anticholinestérasiques (néostigmine, 3318 CT, D.F.P.);

b) s'il existait ou non une corrélation satisfaisante entre les activités inhibitrices de ces substances et leurs pouvoirs potentialisateurs.

Nos essais ont été réalisés avec la méthode manométrique de Warburg-Ammon. – Les extraits musculaires étaient obtenus par congélation à – 25°C, puis broyage dans un mortier, et enfin suspension dans du bicarbonate de sodium 0,025 M; leur concentration terminale était de 1/15. – Les substrats étaient du chlorure d'acétylcholine 0,01 M et du perchlorate de butyrylcholine 0,03 M. – Les solutions de 3318 CT et de néostigmine étaient préparées extemporanément; celles de D.F.P. l'étaient, chaque jour, à partir d'une solution stock à 2% dans du propylèneglycol. – Dans une première série d'essais (*in vitro*), l'inhibiteur était ajouté à l'extrait musculaire 1 h avant l'addition du substrat; dans une deuxième série (*in vivo*), réalisée seulement avec le D.F.P., l'inhibiteur était ajouté au bain où plonge le muscle lui-même; on le laissait, comme dans les essais de potentialisation, 30 min au contact de la préparation qui était ensuite lavée à deux reprises avant d'être congelée et broyée.

Nous signalerons tout d'abord que les extraits de rectus ont fourni les dégaments de CO_2 moyens suivants: avec l'acétylcholine 0,01 M: 48,4 mm³ par h et pour 0,1 g de muscle (déviation standard: 16,2); et avec la butyrylcholine 0,03 M: 13,4 mm³ par h et pour 0,1 g de muscle (déviation standard: 2,8). Ces valeurs concordent avec celles fournies par Cohen et Posthumus[3]. Elles permettent de calculer que la dose contracturante moyenne de chlorure d'acétylcholine (25 γ) peut être hydrolysée en environ 2 min par un rectus de 200 mg, et celle de perchlorate de butyrylcholine (15 γ) en environ 3 min; la contracture du rectus se développant en 3 à 5 min, une hydrolyse limitatrice très importante peut donc, *a priori*, intervenir aussi bien pour la butyrylcholine que pour l'acétylcholine.

Les deux hydrolyses sont inhibées de façon sensiblement égales par la néostigmine dont les CI-50 sont respectivement de $1{,}1 \cdot 10^{-7}$ M dans le cas de l'acétylcholine et de $1{,}5 \cdot 10^{-7}$ M dans celui de la butyrylcholine.

Par contre, des inhibitions très nettement préférentielles sont obtenues avec le 3318 CT (fig. 1) et avec le D.F.P. (fig. 2).

Le 3318 CT – qui, avec d'autres préparations enzymatiques, est un anti-AcChE sélectif (Jacob[5]) – est un

[1] G. B. Koelle, J. Pharmacol. *100*, 158 (1950). – V. B. Brooks et D. K. Myers, J. of Physiol. *116*, 158 (1952).

[2] A. N. Davison, Biochem. J. *54*, 583 (1953). – F. A. Denz, J. exp. Path. *34*, 329 (1953). – J. M. Barnes et J. I. Duff, Brit. J. Pharmacol. *8*, 334 (1953).

[3] J. A. Cohen et C. H. Posthumus, Acta physiol. pharmacol. Neerl. *4*, 17 (1955).

[4] J. Jacob et M. Dechavassine, Exper. *11*, 235 (1955).

[5] J. Jacob, Exper. *10*, 33 (1954); Arch. int. Pharmacodyn. *101*, 446 (1955).

Relations entre les activités inhibitrices et les pouvoirs potentialisateurs du D.F.P.

Concentrations (*M*)	Butyrylcholine			Acétylcholine			Amyltriméthyl-ammonium
	Inhibition des hydrolyses en %		Potentialisation[2]	Inhibition des hydrolyses en %		Potentialisation	Potentialisation
	in vitro[1]	*in vivo*[1]		*in vitro*	*in vivo*		
$1 \cdot 10^{-8}$	89	21	2,7	–	–	–	1
$5 \cdot 10^{-8}$	89	36	4,1	–	–	–	1
$1 \cdot 10^{-7}$	95	76	6,4	7	14	1,1	1,1
$1 \cdot 10^{-6}$	100	93	5	12	14		1,3
$1 \cdot 10^{-5}$				43	15	1,1	1,1
$3 \cdot 10^{-5}$				73	27	1,6	1
$1 \cdot 10^{-4}$				100	67	3,5	0,8
$3 \cdot 10^{-4}$				100	83	9	0,7

[1] Voir texte.

[2] Potentialisation exprimée par le rapport de doses provoquant une contracture d'environ 50% avant et après administration du D.F.P. Depuis la note précédente ([4]), ces essais ont été multipliés et les valeurs publiées ici représentent mieux le phénomène.

Inhibiteur très actif de l'hydrolyse de l'acétylcholine (CI-50: $3{,}2 \cdot 10^{-7}$ *M*), très médiocre par contre de celle de la butyrylcholine (CI-50: $3 \cdot 10^{-4}$ *M*); sa sélectivité – identique à celles signalées par Denz[6] pour le Nu-1250 et le 284 C-51 dans le cas du diaphragme du rat – n'est toutefois pas suffisante pour permettre d'inhiber l'hydrolyse de l'acétylcholine au-delà de 80% sans affecter, modérément mais nettement (10%), l'hydrolyse de la butyrylcholine.

D'autre part, il existe des corrélations satisfaisantes entre les activités anti-AcChE et anti-XChE des substances étudiées et leurs pouvoirs de potentialiser les contractures par l'AcCh et la BuCh.

Pour la néostigmine et le 3318 CT, inhibiteurs réversibles, nous nous limiterons ici à signaler que les potentialisations apparaissent seulement pour des concentrations provoquant, *in vitro*, des inhibitions nettes de l'hydrolyse de l'ester correspondant.

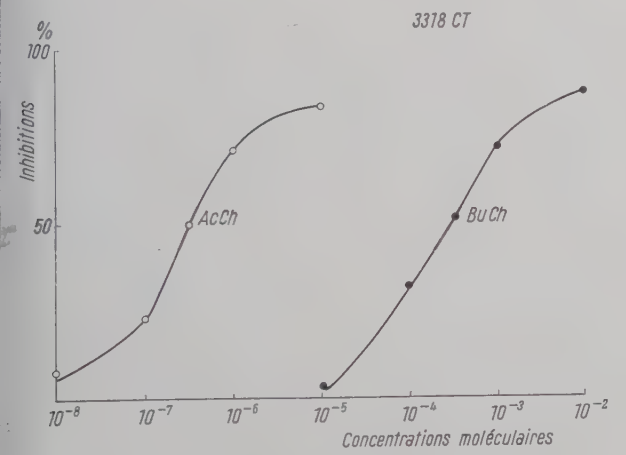


Fig. 1. – Inhibition, *in vitro*, des cholinestérases du rectus de grenouille par le 3318 CT.
En abscisses: Concentrations moléculaires de 3318 CT.
En ordonnées: Inhibitions en %.
○——○ Acétylcholine 0,01 *M*. ●——● Butyrylcholine 0,03 *M*

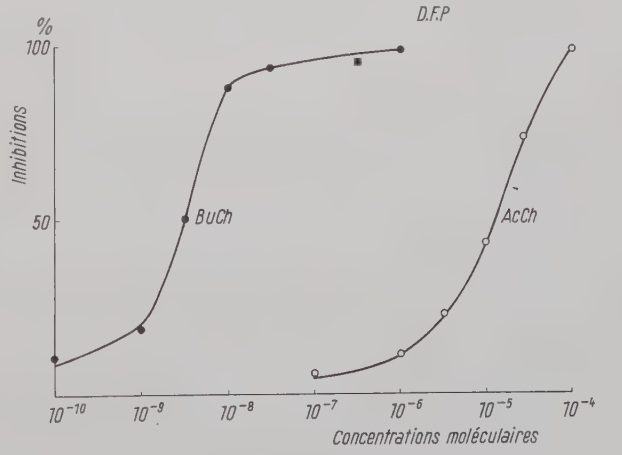


Fig. 2. – Inhibition, *in vitro*, des cholinestérases du rectus de grenouille par le D.F.P.
En abscisses: Concentrations moléculaires de D.F.P.
En ordonnées: Inhibitions en %.
○——○ Acétylcholine 0,01 *M*. ●——● Butyrylcholine 0,03 *M*.

Le D.F.P. inhibe très sélectivement l'hydrolyse de la butyrylcholine, la CI-50 ($3 \cdot 10^{-9}$ *M*) étant, dans ce cas, environ 4000 fois plus faible que dans celui de l'acétylcholine ($1{,}3 \cdot 10^{-5}$). Pour des concentrations convenables ($1 \cdot 10^{-7}$ *M*) l'hydrolyse de la BuCh est presque totalement (95%) supprimée alors que celle de l'AcCh ne l'est que dans les limites des erreurs expérimentales (5%).

Il semble donc bien que les hydrolyses de l'AcCh et de la BuCh soient réalisées par deux enzymes différents, se comportant comme une AcChE et une XChE, et que chacun de ces deux enzymes interviennent peu, s'il le fait, dans l'hydrolyse de l'ester «non spécifique».

Dans le cas du D.F.P., des inhibitions, *in vivo*, ont été mesurées dans des conditions expérimentales superposables – abstraction faite du délai nécessaire à la réalisation ultérieure des extraits et des mesures – à celles dans lesquelles ont été observées les potentialisations. D'une façon générale, ces inhibitions sont inférieures à celles déterminées *in vitro*. Ceci résulte vraisemblablement de ce que le D.F.P. accède plus lentement aux cholinestérases dans le rectus entier que dans l'extrait. La corrélation entre ces inhibitions *in vivo* et les potentialisations des esters respectifs est étroite. Dans l'un et l'autre cas des sensibilisations nettes apparaissent dès que des inhibitions de 20 à 30% sont réalisées. L'amyltriméthylammonium est, contrairement aux esters de la cho-

[6] F. A. Denz, J. exp. Path. *34*, 329 (1953).

line, peu ou pas potentialisé; il en a été de même pour la choline, étudiée dans quelques essais supplémentaires.

Dans ces conditions, on ne peut s'empêcher de penser que la sensibilisation du rectus de grenouille aux deux esters résulte essentiellement d'inhibitions enzymatiques affectant une AcChE, dans le cas de l'acétylcholine, et une XChE, dans celui de la butyrylcholine, et que, dans cet organe, il n'existe pas de «réserve» importante de l'une ou l'autre estérase.

J. Jacob et M. Dechavassine

Laboratoire de Pharmacologie de l'Institut Pasteur, Paris, le 4 juillet 1956.

Summary

The hydrolysis of acetylcholine chloride (0·01 *M*) by frog's rectus extracts, is inhibited by low concentrations of 3318 CT (CI-50 $3{\cdot}2\times10^{-7}$) and high concentrations of D.F.P. (CI-50 $1{\cdot}3\times10^{-5}$). Inversely, the hydrolysis of butyrylcholine perchlorate is inhibited by low concentrations of D.F.P. (CI-50 3×10^{-9}) and high concentrations of 3318 CT (CI-50 3×10^{-4}). Both are inhibited by similar concentrations of neostigmine (CI-50 $1{\cdot}1\times10^{-7}$ and $1{\cdot}5\times10^{-7}$). Frog's rectus thus contains true and pseudo-cholinesterases. The inhibitions produced by D.F.P. added to the muscle itself (and not the extract) correlates well with the potentiation of the corresponding ester. Sensitization to AcCh and to BuCh appears to be specifically related to the inhibition of Ac ChE for the former ester, of XChE for the second one.

Selective Activity of Morphine on the 'EEG Arousal Reaction' to Painful Stimuli

Consulting the accumulated literature on the effect of morphine on the electrical activity of the brain (Wikler[1]; Fujta *et al.*[2]; Gangloff and Monnier[3]), it would appear that no systematic investigation has been carried out on the influence of morphine on the central brain stem activating system (Moruzzi and Magoun[4]). Many authors, however, have attributed to this system an important role. In fact it was recently demonstrated that potentials evoked by peripheral stimulation may be conducted corticipetally as well through the reticular formation and through the great lemniscal fillets and thalamic relay nuclei (French *et al.*[5]). It was assumed that the reticular conduction is related to the maintenance of the alert, wakeful state and with the central integration of sensations[6]. A significant feature of the analgesia is that it occurs in the absence of sleep and without impairment of consciousness and of other sensory perceptions. It therefore seemed reasonable to investigate whether the specific analgesic action of morphine corresponded to a selective influence on different types of afferent stimulations which activate the central brain stem desynchronizing system. The present work considers the influence of morphine on the EEG arousal reaction elicited by sensitive, sensorial, noxious and by electrical stimulation of the reticular substance at the mesencephalic and diencephalic level.

The experiments were performed using unanaesthetized uncurarized rabbits. The registrations of the cortical and subcortical activity, together with the stimulation of deep structures, was carried out with a technique described elsewhere (Longo *et al.*[7]).

The electrical activity of the brain was recorded in the animal at rest and during various types of sensory stimulations (blowing on the nose, buzzer, touching of the back) and of painful stimulations (thermic stimuli applied to the hind leg, pinching of the ear, electrical stimulation of the central end of the cut sciatic nerve and of the auricular nerve). All these kinds of stimulation produce at the cortical and subcortical level a generalized change of the EEG, called desynchronization, or 'arousal response'. This response can also be obtained with electrical stimulation of some deep structures located on the central core of the brain stem (reticular formation) and of the diencephalon (thalamus and hypothalamus). During the experiments, the provocation threshold of the EEG arousal was carefully determined by electrical stimulation of the reticular substance situated in the periaqueductal gray matter at the level of the anterior quadrigeminus body and of the antero-medial nuclei of the thalamus.

After the administration of small amounts of morphine intravenously (5–10 mg/kg), a selective depression of the arousal reaction following painful stimuli can be noticed, while the arousal reaction to the sensory stimuli remains unaltered. At the same time there is a rise in the stimulation threshold of the anteromedial nuclei of the thalamus, not accompanied by a similar variation at the mesencephalic level. As the dose of morphine is increased (10–25 mg/kg), the selective effect becomes less marked and the arousal reaction to any type of stimulation is blocked.

On the other hand, in control experiments small amounts of scopolamine (0·01–0·02 mg/kg intravenously) and Pentobarbital (5–15 mg/kg intravenously) blocked more significantly the sensitivo-sensorial arousal reaction than that provoked by the nociceptive stimuli. Moreover, these drugs act equally on the reticular substance of the thalamus and mesencephalon.

Bernhaut *et al.*[8], studying the effectiveness of various stimuli in eliciting the arousal reaction, found that the sequence of the stimuli, listed in order to produce an arousal reaction, are: pain, proprioception, auditory stimulation, optic stimulation. The ability of morphine to change this sequence would appear to be highly significant.

One of the more important factors of the analgesic action of morphine is its influence on the differentiation between suffering and pain experience. The patients, after morphine administration, still affirm that they perceive the painful stimulations, but without suffering (Wolff[9]). This selective blocking by morphine of the arousal reaction with respect to painful stimuli would indicate that it has a specific action on the

[1] A. Wikler, Pharmacol. Rev. *2*, 435 (1950).

[2] S. Fujta, M. Yasuhara, S. Yamamoto, and K. Ogiu, Jap. J. Pharmacol. *4*, 41 (1954).

[3] H. Gangloff and M. Monnier, Helv. physiol. Acta *13*, 47C (1955).

[4] G. Moruzzi and H. W. Magoun, EEG Clin. Neurophysiol. *1*, 455 (1949).

[5] J. D. French, M. Verzeano, and H. W. Magoun, Arch. Neurol. Psychiat. *69*, 505 (1953).

[6] *Brain Mechanisms and Consciousness*, A Symposium (Blackwell, Oxford 1954).

[7] V. G. Longo, G. P. Von Berger, and D. Bovet, J. Pharmacol. *111*, 349 (1954).

[8] M. Bernhaut, E. Gellhorn, and A. T. Rasmussen, J. Neurophysiol. *16*, 21 (1953).

[9] H. G. Wolff, Physiol. Rev. *27*, 167 (1947).

reticular integration of pain, especially at the thalamic level.

B. Silvestrini and V. G. Longo

Laboratory of Therapeutic Chemistry, Istituto superiore di Sanità, Rome, July 24, 1956.

Résumé

L'action de la morphine sur l'activité électrique cérébrale a été étudiée sur le lapin ni anesthésié ni curarisé. La réaction d'arrêt, qui se traduit par une désynchronisation du tracé EEG, consécutive à un stimulus douloureux (stimulation du nerf sciatique, pincement de l'oreille) est abolie par des doses de morphine qui n'influencent pas les modifications analogues du tracé EEG provoquées par les stimulations sensitives ou sensorielles (stimulation olfactive, acoustique ou tactile).

Une telle spécificité, qui n'apparaît pas dans le cas de la scopolamine et des barbituriques (Pentobarbital), peut être mise en rapport avec l'action analgésique caractéristique de la morphine.

Spontaneous Anastomosis Between Surgically Closed Intestinal Loops

In surgical practice it is taken for granted that any transected portion of the alimentary tract can be induced to close and seal its lumen reliably and permanently. In an intestine of small caliber a satisfactory closure can be effected by simply tying it off with a thread which may even be of absorbable material (catgut). Necrobiotic and reparative reactions dispose of the tie and furnish a tissue seal which in due course of time solidifies into a scar. Numerous appendectomies executed with this technique prove that for the human appendix, at least, this method is adequate.

In dealing with intestinal segments of larger caliber a mere ligation is considered insufficient, and recourse is taken to more involved techniques which effect a folding of the intestinal wall over the line of closure bringing the outer, serosal, layer in broad contact with itself. The serosal layer of the intestines possesses marked fibrino- and fibro-plastic faculties which, if utilized properly, render the closure water-tight within seconds; within a few weeks the closed intestines can withstand even excessive strains: abnormally high intra-enteric pressure will dilate the gut and may cause a blow out, but usually not at the point of closure.

This sealing and cicatrizing process can, of course, be halted and reversed by marked failure of local tissue nutrition and by infection. If this occurs the result is a surgical calamity. Herewith are reported observations indicating that suppression of the sealing process can obtain under circumstances not leading to clinical emergencies but, on the contrary, to a fortuitous development. I have observed that intestinal segments closed with proper surgical methods can be made to open after a few days and to establish connection between their lumens. This paradoxical behaviour has been accidentally observed in human patients and to some extent, it has been reproduced in the following experiments:

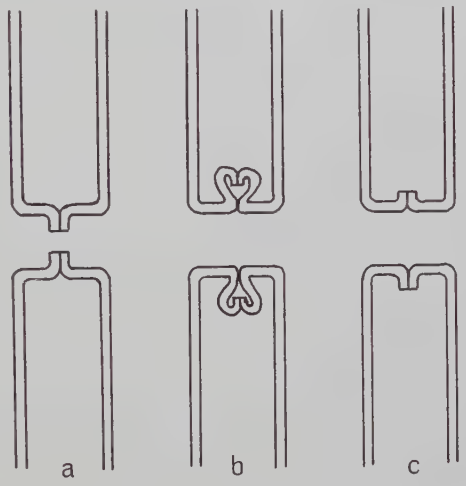
Thiry-Vella loops were prepared in dogs by excluding segments of small intestines, 10 cm long, from the continuity of the alimentary tract and inserting the ends into the abdominal surface. The loops remained, of course, residing in the abdominal cavity with their mesenteric blood vessels intact. The loops were transected at their midpoint, and the resulting cross sections were closed with several standard suture techniques as indicated below. The matching halves of each Thiry-Vella loop were closed identically, fine nylon thread being used.

In 2 instances closure was effected by a single row of non-inverting sutures (Fig. 1*a*).

In 1 instance the non-inverting suture line was covered by a second row of a sero-muscular suture (Fig. 1*b*).

In 2 instances closure was effected by a single row of inverting sutures (Fig. 1*c*).

The closed segments of the Thiry-Vella loops were then brought together by suturing them in axial alinement. Outwardly, they were reconstructed while their lumen was interrupted by a double diaphragm of intestinal wall. The broad, tension-free contact of the serosal coats should have assured smooth and solid healing of the closed ends.



Diagrams of types of intestinal closures used in experiments. (*a*) Mucosa everted. (*b*) Mucosa everted, but burried with Lembert sutures. (*c*) Mucosa inverted. Type *a* and *b* seemed to favor establishment of a spontaneous anastomosis.

Instead, in three out of five a connection established itself between the lumens of the two segments. It was found by irrigating through the orifices of the loops that perforation of the diaphragms occurred between the 9th and the 14th day. This was, of course, verified by autopsy.

It might be significant that in the two instances where the closure remained permanent the suture method used was identical, a single row of mucosa *in*verting sutures, a method that has been found superior but not indispensable for effecting intestinal closure. Conversely, the instability of the other types of closure is probably explained by the presence of everted mucosal wound edges. These mucosal tabs easily provide a nidus of infection in the pocket created by the approximated serosal surfaces. The infection will sustain itself until it erodes the lines of closure and the exudate can drain into the intestinal lumen.

This explanation is apparently supported by the following experiments: Six Thiry-Vella loops were prepared and divided as before and all cross sections closed with non-inverting sutures. In this series the animals were given massive doses of an antimicrobial drug (Neomycin). The dogs recovered much more readily, but none of the six obstructed loops opened. At autopsy it was found that the mucosal layers were reconstructed perfectly in the cul-de-sac formed by the blind ends. From the preceding experiments one would have expected a high incidence of spontaneous anastomosis since projections of mucosa into serosal pockets were created in all of them. However, Neomycin suppressed infection, and this therapeutic effect prevented erosion of the intestinal sutures.

Statistically these experiments may be unimpressive but they corroborate some rather unusual clinical observations made on seven patients who had undergone intestinal resections. For various reasons intestinal continuity in these cases had not been restored by a typical anastomosis; instead, the cut ends of the remaining gut were closed with one or several rows of sutures and then approximated. Since this procedure would leave the bowels obstructed it was necessary to establish a colostomy proximal to the site of operation. It was assumed that the intestines could be de-obstructed later on by perforating the closed loops with an instrument introduced through the colostomy and the latter be closed. In six of the seven patients the obstructing diaphragms dissolved, and intestinal continuity established itself. The patient in whom it became necessary to perforate it (with a high frequency electrode) had a particular lesion which might explain the different behavior. She had radiation stenosis of the colon with atrophy of the intestinal mucosa.

The spontaneous dissolution of the obstructions could be recognized by rectal palpation in two patients on the 9th and 12th day respectively. In the others due to inaccessibility of the site this had to be demonstrated more indirectly and, therefore, less promptly, as by the appearance of irrigation fluid or stool in the rectum. Patency was recorded in these cases 18, 21, and 51 days after operation. For one patient there was no adequate record extant except that at autopsy, one year later, the intestinal passage was found spontaneously restored and the proximal colostomy closed.

G. E. Gruenfeld

Laboratory Division of the Jewish Hospital and Departments of Surgery of The Jewish Hospital and Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, July 11, 1956.

Zusammenfassung

Nach atypisch durchgeführter Darmresektion wurden an 6 Patienten Spontan-Anastomosen beobachtet. Die Darmenden wurden vernäht oder abgebunden und die geschlossenen Segmente an den Enden angenähert. Eine beginnende Einschmelzung der Trennungswände wurde zwischen dem 9. und 51. Tag beobachtet. Sehr ähnliche Resultate wurden an nach Thiry-Vella isolierten Darmschlingen erzielt. Die Bedingungen für das Auftreten von Spontan-Anastomosen werden diskutiert.

Persistance d'un train d'ondes électriques ternaire dans toute entité fonctionnelle isolée du cœur de *Rana esculenta*

Des observations cliniques il découle que l'électrocardiogramme (ECG) est constitué d'un train d'ondes avec une phase P auriculaire et des phases QRS et T ventriculaires. Cependant quelques expérimentateurs[1] ont constaté que des oreillettes de cœurs de Poïkilothermes produisent un train d'ondes électriques diphasique avec une onde rapide de sommet R et une onde lente T et non pas une onde P isolée.

Mettant en œuvre un montage électronique permettant de déceler 5 μV[2] nous avons pu constater, par une série d'expériences de sections portant sur plus de cent animaux, que tout ensemble morphologique doué d'automatisme du cœur de grenouille donnait lieu à la formation d'un train d'ondes *ternaire* à sommets P-R-T. Pour les expériences comparatives *in situ* on utilisait des électrodes impolarisables constituées par des pinceaux pour aquarelle imbibés d'une solution de Ringer non-phosphatée. Les expériences *in vitro* étaient conduites en solution de Ringer non-phosphatée avec l'appareillage original décrit antérieurement[3] muni d'un pré-amplificateur à double triode 12 AX 7 fonctionnant sur accumulateurs 6 V–20 A[2]. Le tableau ci-contre montre l'allure des tracés obtenus avec *Rana esculenta*, adultes de même sexe (♀) et poids (25 g), à 20°C. Les sections doivent être franches et effectuées d'un seul coup de ciseaux. Notons que dans nos conditions expérimentales les oreillettes isolées peuvent battre près d'une journée.

Nos observations viennent pleinement confirmer l'opinion de Frédéricq selon laquelle les évènements QRS et T ne sont pas nécessairement ventriculaires; de plus, elles ouvrent la porte à des interprétations plus générales de l'ECG et rendent par ailleurs légitime l'emploi du seul système sino-auriculaire, très maniable, pour les études sur les métabolismes électrogènes et automatogènes. L'unicité du train d'ondes ternaire pour des structures fonctionnelles de complexité croissante (systèmes: sinus seul, sinus-oreillette droite, sinus-deux oreillettes, sinus-oreillettes-ventricule) paraît être la conséquence de «court-circuitages» successifs, de relances, d'ondes solidaires *élémentaires* dont l'amplitude croît d'une façon explosive à mesure qu'elle intéresse un plus grand nombre d'éléments cardiaques (voir table p. 439).

B. Rybak et J. Retail

Laboratoire de Physiologie générale, Faculté des Sciences de Bordeaux, Talence (Gironde), le 18 juillet 1956.

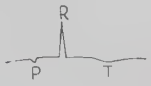
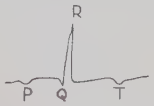
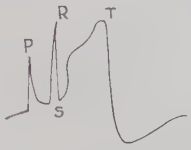
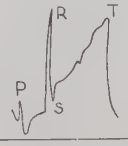
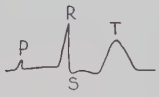
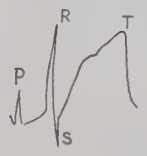
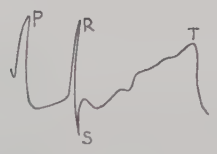
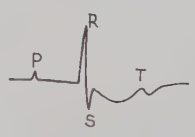
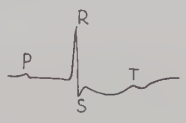
Summary

An original, highly quantitative and sensitive method designed to study the automatism of isolated, non-perfused, contractile systems has been especially applied to electrical analysis of frog heart in prolonged survival. It was established by systematic sections that every functional entity as elementary as the sinus venosus, produces a ternary electrogram with P–R–T deflexions. In view of these results, every theory of the ECG has to be reconsidered.

[1] H. Frédéricq, *Aspects actuels de la physiologie du myocarde* (P.U.F. 1927). – W. Eiger, Pflügers Arch. ges. Physiol. *151*, 1 (1923).

[2] B. Rybak, P.-V. Soc. Linn. Bordeaux, séance du 18 février 1956.

[3] B. Rybak, C. r. Acad. Sci. *242*, 282 (1956).

Désignation du système	50 μv, 1 s	200 μv, 1 s
	in vitro	
Sinus veineux		
Sinus-oreillette droite		
Ensemble sino-auriculaire		
Cœur sagittal (partie droite sino-auriculo-ventriculaire) ensemble fonctionnant plus de 12 h à 20° C dans du Ringer non-phosphaté.		
Cœur subtotal (cœur entier privé de son oreillette gauche) 17 h de survie à 20° C dans du Ringer non-phosphaté.		
Cœur entier (le ventricule s'arrête après 1–2 h dans du Ringer non-phosphaté à 20° C; l'ensemble sino-auriculaire poursuit son fonctionnement pendant plus de 12 h).		
	in situ	
Cœur entier (position des électrodes: oreillette gauche. pointe ventriculaire).		
Ensemble sino-auriculaire (le ventricule est arrêté pour une pince hémostatique).		

Die Elemente der Entfernungsmitteilung im Tanz der Bienen (*Apis mellifica*)

In ausführlichen Arbeiten haben sich v. Frisch[1] und Heran[2] mit den Elementen der Entfernungsmitteilung im Tanz der Bienen beschäftigt.

Während für Futterplatzentfernungen bis etwa 100 m die sogenannten Rund- und Sicheltänze ausgeführt werden, deren zeitlichen Ablauf man bisher nicht genauer untersuchte, tanzen die Bienen bei Futterplatzentfernungen über 100 m den Schwänzeltanz. Dieser besteht im wesentlichen aus dem rhythmischen Durchlaufen der in Abbildung 1 gezeigten Figur. Hierbei führen sie auf der mit S bezeichneten Strecke Abdomenschwingungen (Schwänzelbewegungen) durch. v. Frisch fand eine Relation zwischen Futterplatzentfernung und benötigter Zeit für das Durchlaufen der Strecke $S + R$. Darin erkannte er ein wichtiges Element der Entfernungsmitteilung. Eine genaue Analyse der Schwänzelbewegungen wurde aber noch nicht gegeben. Die Beobachtung dieser Bewegungen ist besonders schwierig, da sie eine für

[1] K. v. Frisch, Öster. zool. Z. *1*, 1 (1948).
[2] D. Heran, Z. vergl. Physiol. *1*, 2 (1956).

unser Auge hohe Frequenz von etwa 15 Hz besitzen, nicht rein periodisch sind und nicht ortsgebunden erfolgen.

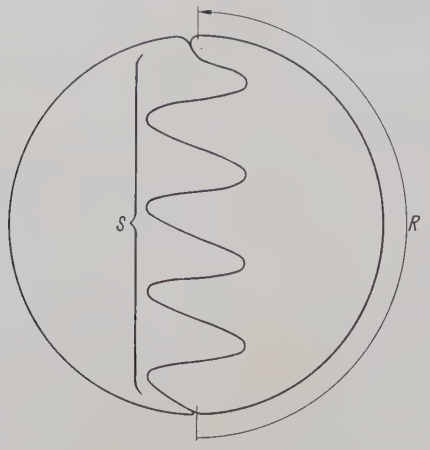


Abb. 1.

Es wurde eine Methode entwickelt[3], die es erlaubt, Wendungsdauer (Zeit für das Durchlaufen der Strecke $S + R$), Dauer der Schwänzelphase S, Frequenz der Schwänzelbewegungen und deren relative Amplitude mit sehr grosser Genauigkeit zu registrieren. Es kann also eine Beschreibung des zeitlichen Ablaufs aller wichtigen Bewegungen während des Schwänzeltanzes gegeben werden.

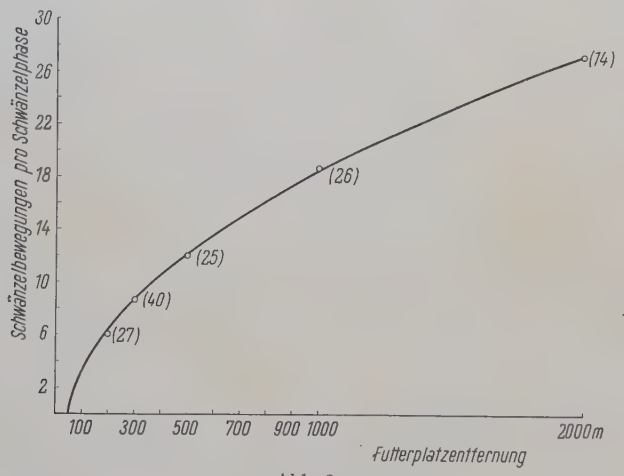


Abb. 2.

Neben der von v. Frisch festgestellten Gesetzmässigkeit der Wendungsrhythmik zeigen die dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche eine offensichtliche Abhängigkeit der Anzahl der Schwänzelbewegungen pro Schwänzelphase S von der Futterplatzentfernung. Die Darstellung dieser Gesetzmässigkeit ist in Abbildung 2 wiedergegeben. Die Messungen wurden bei stufenweiser Rückdressur einer Bienenschar von 2000 auf 200 m vorgenommen. Die in der Abbildung aufgetragenen Werte sind aus der jeweils bei jedem Messpunkt angegebenen Anzahl der Messungen gemittelt. Es wurden bewusst wenig Messungen verwendet, da den Bienen schon wenige Wendungen eine ausreichende Information über die Entfernung des Futterplatzes geben. Ein wesentlicher Bestandteil der Entfernungsmitteilung muss schon aus wenigen Messungen erkennbar sein.

[3] H. Esch, Naturwissensch. *41* (9), 207 (1956).

Extrapoliert man die in Abbildung 2 gezeigte Kurve für niedrigere Entfernungen als 200 m, so gelangt man zu einem Schnittpunkt der Kurve mit der Entfernungsachse bei ungefähr 50 m. Hier werden keine Schwänzelbewegungen mehr ausgeführt. Der Verständigung mit Hilfe der Schwänzelbewegungen ist eine begreifliche Grenze nach unten gesetzt. Die Sicheltänze[4] sind als Grenzwert der Schwänzeltänze aufzufassen. Die ruckartigen Wendungen an den Sichelspitzen haben die Bedeutung «eine» Schwänzelbewegung. Das langsame Anwachsen der Schwänzelbewegungen mit zunehmender Entfernung bei nahe gelegenen Futterplätzen wurde schon von Tschumi in der oben angeführten Arbeit beschrieben.

Der Verlauf der in Abbildung 2 gezeigten Kurve ist temperaturabhängig. Die Versuche wurden bei einer Durchschnittstemperatur von 20°C aufgenommen. Für höhere Temperaturen verschiebt sich die Kurve gegen den Nullpunkt.

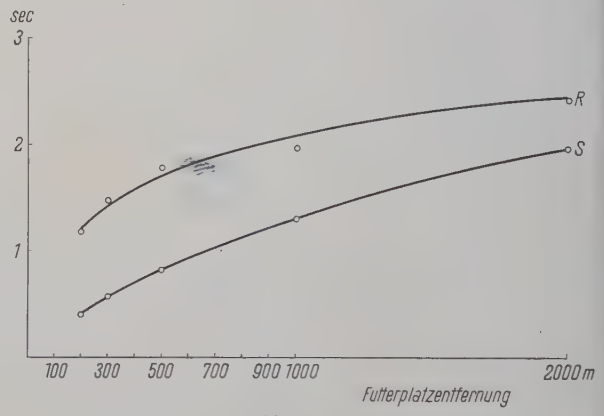


Abb. 3.

Die Frequenz der Schwänzelbewegungen beträgt durchschnittlich 15 Hz. Die einzelnen Schwingungen sind aber untereinander hinsichtlich ihres zeitlichen Verlaufes nicht genau gleich, ausserdem sind sie von Schwingungen höherer Frequenz überlagert.

Berechnet man die Streuung der mitgeteilten Entfernung nach der Rhythmik der Wendungen und aus den gleichen Messungen die Streuung aus der Anzahl der Schwänzelbewegungen, so kommt man zu den in der Tabelle dargestellten Ergebnissen. Daraus lässt sich nicht mit Sicherheit erkennen, welcher Teil des Schwänzeltanzes die Futterplatzentfernung zuverlässiger weisen kann. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass beide Gesetzmässigkeiten einen wichtigen Teil der Entfernungsmitteilung darstellen. Eine mathematische Beschreibung des gesamten Tanzgeschehens, die im Augenblick durchgeführt wird und an anderer Stelle veröffentlicht werden soll, bringt einen einleuchtenden Zusammenhang zwischen diesen beiden Elementen der Entfernungsmitteilung.

Die verhältnismässig grosse Streuung findet in den Stufenversuchen v. Frischs eine Erklärung. Es hat sich gezeigt, dass nicht alle Bienen genau den Futterplatz anfliegen, sondern in einer Zone um den Futterplatz suchen, welche etwa mit dem von uns berechneten Streubereich zusammenfällt. Man darf daher annehmen, dass die Entfernungsmitteilungen sehr genau verstanden werden.

In Abbildung 3 wurden die für das Durchlaufen der Strecke S und R benötigten Zeiten aufgenommen. S und

[4] D. Tschumi, Schweiz. Bienenztg. *73* (3) (1950). – G. Hein, Exper. *6*, 142 (1950).

Die Streuung der Entfernungsweisung		
bei	durch	
utterplatzentfernung m	Wendungsrhythmik m	Schwänzelbewegung m
200	± 55	± 55
300	± 79	± 100
500	± 232	± 130
1000	± 314	± 295
2000	± 1400	± 670

? stehen in keinem konstanten Verhältnis zueinander. Es zeigte sich, dass das Verhältnis $S:R$ für kleine Entfernungen < 1 ist, während es sich für grosse Entfernungen dem Werte 1 nähert.

Die verschiedenen Bewegungsformen während des Schwänzeltanzes sind als die Elemente der Entfernungsweisung anzusehen. Eine genaue Beschreibung ihres zeitlichen Ablaufes wurde gegeben.

H. Esch

Bonn, den 19. Juli 1956.

Summary

The exact description of the temporal functions of all important movements during the wagtail-dance of bees is given.

The frequency of the wagtail-movements amounts to 15 Hz. Their number per cycle depends upon the distance between bee-hive and feeding place.

With the same accuracy the a.m. distance is shown either by the rhythm of cycle or by the number of wagtail-movements per cycle.

Dimethyltryptamin: Its Metabolism in Man; the Relation of its Psychotic Effect to the Serotonin Metabolism

We tested dimethyltryptamin (DMT) in man, and found it to have a psychotic effect partially similar to that caused by meskalin or LSD-25[1]. The main symptoms are: visual hallucinations and illusions, distorsion of the spatial perception and body image, disturbances of the thought and speech, euphoria. Sympathicomimetic signs, such as mydriasis, elevation of the blood-pressure, etc., can also be found. This model psychosis differs, however, from those hitherto known in some respects; the most striking difference is that the psychic symptoms appear in 3–5 min after the injection, and pass away within 1 h. This mode of action suggested the *direct* connection of the psychosis with the introduced DMT. Therefore it seemed to be of great interest to investigate DMT-metabolism in man.

We have synthetized DMT by the method of Speeter and Anthony[2]. The aqueous solution of its hydrochloric salt has been administered intramuscularly to 20 normal volunteers in doses ranging from 0·7 to 1·1 mg/kg body weight. The urines were collected before and after the injection, and were analyzed for indolic compounds by paper chromatography and by colorimetry.

The metabolites of DMT have been studied in rats by Erspamer[3]. He has found that 3-indoleacetic-acid (3-IAA) and 3-indole-aceturic acid are the main breakdown products excreted by the urine. We have worked with a different method to that of Erspamer, namely the urine samples were extracted with peroxide-free ether four times at pH 2–3; then with *n*-butanol four times at the same pH and at pH 12. The extracts were then evaporated *in vacuo* to dryness and the residue redissolved in 50 per cent ethanol. Paper chromatographic analysis was performed in Schleicher-Schüll 2043 paper two-dimensionally, ascending with *n*-butanol saturated with 10 per cent aqueous ammonia in the first, and *n*-butanol: acetic acid: water (4:1:5) in the second dimension. Standards of DMT, 3-IAA and 5-hydroxy-IAA (5-HIAA) were made for each chromatogram. To develope the indole spots, chromatograms were sprayed with 2 per cent *p*-dimethylamino-benzaldehyde in 1·2 *N* HCl and were allowed to stand at room temperature for 1 h[4]. The quantitative determination of 3-IAA was carried out from an aliquot of the ethereal extract colorimetrically with *p*-dimethylamino-benzaldehyde and sulfuric acid in the presence of $Fe^{\cdots}$ ions. The quantity of the other components was estimated by comparing the spots to the known standards in the chromatograms. The results are as follows:

(1) Only 3-IAA can be extracted from the urine by ether as could be demonstrated by paper chromatography. Quantitative determinations have shown that by that method 96% could be recovered from the given 3-IAA.

(2) Free 3-IAA could be demonstrated in the urine collected 6 h after the administration of DMT; the amount of 3-IAA was 8·3%, calculated as equivalent to the given DMT (average of 6 cases).

(3) When the urine samples were alkalinized with KOH to pH 11–12 and allowed to stand at room temperature for 4–6 h, the amount of the extractable 3-IAA was found to be 24·9%, calculated as above.

(4) Urine of normal control subjects, collected over a 24 h period, contains 1·5–3·0 mg 3-IAA after the above mentioned alkaline hydrolysis.

(5) After DMT experiments, we could not demonstrate unchanged DMT in the alkaline butanol extracts of urine.

(6) 2–4 times more 5-HIAA could be found in the excreted urine after the administration of DMT than before. We obtained these results with the acidic butanol extraction method.

The above-outlined data show that the main metabolite of DMT in man is 3-IAA; two-thirds of it is bound in alkalilabile form.

The lack of unchanged DMT in the urine suggests that the breakdown process in man is similarly rapid as has been shown in rats[5]. The very rapid metabolism of DMT may be the explanation for the short duration of the psychosis. The quick onset and the above-mentioned short duration is a new feature in contrast to the hitherto used psychotics as meskalin, LSD-25, etc. These latter substances produce their psychotic effect only 1–2 h after the administration[6].

The enrichment of the excreted urine in 5-HIAA after the administration of DMT is a very interesting fact.

[1] St. Szára, A. Sai-Halász, G. Brunecker, and Z. Böszörményi, Lancet *1956*, in press.

[2] M. E. Speeter and W. C. Anthony, J. Amer. chem. Soc. *76*, 6209 (1954).

[3] V. Erspamer, J. Physiol. *127*, 118 (1955).

[4] B. M. Twarog and I. Page, Amer. J. Physiol. *175*, 157 (1953).

[5] V. Erspamer, J. Physiol. *127*, 118 (1955). – M. S. Fish, N. M. Johnson, E. P. Lawrence, and E. C. Horning, Biochim. biophys. Acta *18*, 564 (1955).

[6] W. Block, Z. physiol. Chem. *294*, 1 (1953).

There are two possible mechanisms to explain this elevation. Either DMT, or its breakdown products, were oxydated at the 5-position of the indol nucleus to produce 5-HIAA, or the endogenous Serotonin were metabolized to a greater degree. The latter possibility seems to be the more probable one[3], but this ought to be proved by radioactive, isotope-labelled DMT. This would provide further support for the hypothesis of Brodie *et al.*[7] that Serotonin plays an important role in brain function.

St. Szára

Central State Institute for Nervous and Mental Diseases, Budapest-Lipótmezö, Hungary, July 31, 1956.

Zusammenfassung

Es wird festgestellt, dass Dimethyltryptamin – bei normalen Versuchspersonen – eine dem Meskalin und dem LSD-25 ähnliche psychotische Wirkung hat. Der durch Dimethyltryptamin induzierte Zustand beginnt schon 3–5 min nach Injektion und verschwindet bereits nach 1 h. Der Urin der Versuchspersonen wurde papierchromatographisch und kolorimetrisch auf Indolverbindungen geprüft. 3-Indolylessigsäure wird als hauptsächlichstes Abbauprodukt des Dimethyltryptamins gefunden, wovon der grösste Teil in alkali-labiler Form gebunden ist. Die Menge der ausgeschiedenen 5-Hydroxyindolylessigsäure ist nach dem Versuch wesentlich grösser als vorher. Die Stoffwechselzusammenhänge mit dem psychotischen Zustand werden diskutiert.

[7] B. B. Brodie, A. Pletscher and P. A. Shore, Science *122*, 968 (1955).

DISPUTANDUM

Wirkung der Glutaminsäure auf die experimentelle Isoniazid-Schädigung peripherer Nerven bei Ratten

Kürzlich wurde von Cedrangolo[1] über eine antagonistische Wirkung der Glutaminsäure (Gs.) gegenüber allgemein-toxischen Effekten des Isoniazids (INH) berichtet: bei gleichzeitiger intramuskulärer oder oraler Verabreichung von Gs. und INH im Gewichtsverhältnis von 10:1 gelang es bei Ratten, Kaninchen und Meerschweinchen, die Letalität einmaliger, grosser Dosen INH beträchtlich herabzusetzen.

Auch beim Menschen konnten allgemein-toxische Nebenwirkungen des INH durch Gs. gemildert werden.

Ähnliche entgiftende Eigenschaften zeigen bei der akuten INH-Vergiftung im Tierversuch auch verschiedene Vitamine, nämlich Vitamin B_6[2], B_{12}[3], B_2, A, E, K und Nikotinsäureamid[4]. Von diesen hat sich das Vitamin B_6 bei der Prophylaxe der sogenannten INH-Polyneuritis des Menschen klinisch sehr gut bewährt[5].

Nachdem es uns[6] in früheren Versuchen gelungen war, die an Ratten durch fortgesetzte Verabreichung grosser INH-Dosen erzeugbare periphere Nervendegeneration durch Injektion von Pyridoxin, Pyridoxamin und Pyridoxal-5-phosphat, nicht aber durch die Vitamine B_1, B_2, Pantothensäure, Nikotinsäureamid, Vitamin B_{12}[8] und A zu hemmen, erschien es von Interesse, abzuklären, ob auch Gs. die ausschliesslich den *peripheren* Nerven treffende Toxizität grosser INH-Dosen herabzumindern vermag.

Versuchsanordnung. Gruppen von je 5 männlichen 40–45 g schweren, weissen Inzuchtratten vom Wistar-Stamm eigener Zucht erhielten in einer «synthetischen» mit allen notwendigen Vitaminen ergänzten Diät während 14 Tagen 0,25% INH (entsprechend durchschnittlich 200–250 mg/kg/Tag) als Zusatz verabreicht. In dieser Zeit entwickeln sich, wie aus früheren Versuchen bekannt war, bei allen Tieren ausgedehnte Schädigungen der peripheren Nerven, die histopathologisch durch herdförmige Degeneration der Markscheiden mit Blähung, scholligem Zerfall des Myelins und Auftreten von grossen Tropfen Neutralfett charakterisiert sind. Zur Erfassung des Schweregrades der Nervenschädigung wurden, wie früher ausführlich beschrieben[9], von jedem Tier zwei mit Fettrot 7 B bzw. Sudanschwarz B gefärbte Gefrierschnitte histopathologisch untersucht und bezüglich Markscheidenblähung und Neutralfettbildung mit 0 bis +++ bewertet. Durch Bildung des arithmetischen Mittels aller Einzelwerte lässt sich der durchschnittliche Schweregrad der Markscheidendegeneration einer Tiergruppe zahlenmässig ausdrücken.

Zur Abklärung einer allfälligen Hemmwirkung der Gs auf die Entstehung der Nervenschädigungen wurde verschiedenen Tiergruppen 0,1% bzw. 0,5%, bzw. 1%, bzw. 5%, bzw. 10% Gs. unter die INH-haltige Diät gemischt.

Zwei Kontrollgruppen erhielten entweder nur INH oder überhaupt keinen Zusatz zur Diät. Nach 15tägiger Behandlung wurden alle Tiere getötet, die Ischiasnerven in der beschriebenen Weise präpariert, untersucht und bezüglich Markscheidenschädigung bewertet.

Ergebnisse. Durchschnittliche Zunahme des Körpergewichtes und durchschnittlicher Schweregrad der peripheren Nervendegeneration der verschiedenen Versuchsgruppen sind in nachfolgender Tabelle dargestellt.

Es ergibt sich, dass weder kleine (0,1%) noch sehr grosse und bereits leicht toxisch wirkende (10%) Zusätze von Gs. zur 0,25% INH-enthaltenden Diät die schädigende Wirkung des Antituberkulotikums auf die peripheren Nerven zu beeinflussen vermögen. Sämtliche Tiere zeigen histopathologisch zahlreiche Degenerationsherde in den Markscheiden des *N. ischiadicus*. Der durchschnittliche Schweregrad der Nervendegeneration

[1] F. Cedrangolo, Scientia med. ital. *3*, 450 (1955).

[2] R. H. Reilly, K. F. Killam, E. H. Jenney, W. H. Marshall, T. Tausig, N. S. Apter und C. C. Pfeiffer, J. Amer. med. Ass. *152*, 1317 (1953). – B. Fust und E. Böhni, *Therapie der Tuberkulose mit Isoniazid (Rimifon)* in *Therapie der Lungentuberkulose* (Huber, Bern und Stuttgart 1953).

[3] B. Fust und E. Böhni, *Therapie der Tuberkulose mit Isoniazid (Rimifon)* in *Therapie der Lungentuberkulose* (Huber, Bern und Stuttgart 1953). – S. Ata und K. Tanaka, Lancet 1952/II, 589.

[4] B. Fust und E. Böhni, *Therapie der Tuberkulose mit Isoniazid (Rimifon)* in *Therapie der Lungentuberkulose* (Huber, Bern und Stuttgart 1953).

[5] G. W. Klinghardt, K. L. Radenbach und S. Mrowka, Wien. med. Wschr. *104*, 301 (1954). – J. P. Biehl und R. W. Vilter, Proc. Soc. exper. Biol. Med. *85*, 389 (1954); J. Amer. med. Ass. *156*, 1549 (1954). – R. Oestreicher, S. H. Dressler und G. Middlebrook, Amer. Rev. Tuberc. *70*, 504 (1954).

[6] G. Zbinden und A. Studer, Z. Tuberk. *107*, 97 (1955); Int. Z. Vitaminforsch. *26*, 130 (1955); Schweiz. Z. Path. Bakt. *18*, 1198 (1955).

[7] G. W. Klinghardt, Verh. Dtsch. Ges. inn. Med., 60. Kongress, München, 25. bis 29. April 1954, S. 764. – G. W. Klinghardt, K. L. Radenbach und S. Mrowka, Wien. med. Wschr. *104*, 301 (1954). – G. Zbinden und A. Studer, Z. Tuberk. *107*, 97 (1955); Int. Z. Vitaminforsch. *26*, 130 (1955).

[8] G. Zbinden und A. Studer, unveröffentlicht.

[9] G. Zbinden und A. Studer, Z. Tuberk. *107*, 97 (1955); Schweiz. Z. Path. Bakt. *18*, 1198 (1955).

INH % in Diät	Glutaminsäure % in Diät	Von je 5 Ratten nach 15 Tagen überlebend	Durchschnittliche Veränderung des Körpergewichtes in g	Durchschnittl. Schweregrad der periph. Nervendegeneration
0,25	–	5	6,8 (– 2 +13)	1,49
0,25	0,1	4	5,3 (– 8 +14)	1,27
0,25	0,5	5	6,8 (– 3 +16)	1,11
0,25	1,0	5	14,4 (+ 2 +20)	1,37
0,25	5,0	5	11,0 (0 +22)	1,37
0,25	10,0	5	–1,0 (– 9 + 7)	1,47
–	–	5	26,2 (+18 +33)	0

der mit Gs. behandelten Ratten ist von demjenigen der nur mit INH gefütterten Tiere nicht signifikant verschieden. Auch die als allgemein-toxischer Effekt des INH zu wertende Wachstumshemmung wurde durch Gs. nicht signifikant beeinflusst ($p > 0,05$).

Besprechung der Resultate. Grosse INH-Dosen führen bei Versuchstieren einerseits zu akuten, allgemein-toxischen Symptomen, wie Krämpfen und raschem Absterben, andererseits schädigen sie selektiv die Markscheiden peripherer Nerven. Während die allgemein-toxischen Symptome durch verschiedenartige Stoffe, wie Vitamin B_2, B_6, B_{12}, A, E, K, Nikotinsäureamid und Glutaminsäure, gemildert werden können, vermag nach den heutigen Kenntnissen einzig das Vitamin B_6 auch die durch grosse INH-Dosen experimentell erzeugte Schädigung der peripheren Nerven hemmend zu beeinflussen[6]. Nach den vorliegenden Ergebnissen modifiziert Gs. weder qualitativ noch quantitativ den Ablauf der experimentellen Isoniazid-«Neuritis». Dies gibt einen weiteren Hinweis, dass bei der Entstehung der Isoniazid-Schädigung peripherer Nerven bei Mensch und Tier die mit Vitamin B_6 in Beziehung stehenden Fermentsysteme betroffen sind. Substanzen, die Isoniazid über einen andern Mechanismus entgiften, besitzen keine schützende Wirkung gegenüber der neurotoxischen, auf die Markscheiden der peripheren Nerven gerichteten Wirkungskomponente des INH.

G. Zbinden und A. Studer

Abteilung für experimentelle Medizin der F. Hoffmann-La Roche & Cie, AG., Basel, den 8. September 1956.

Summary

Glutamic acid does not, either in small or in large doses, inhibit the degeneration of the medullary sheath of peripheral nerves in rats, induced within 15 days by addition of 0·25% of isoniazid to their diet. The detoxicating effect of glutamic acid, as described by Cedrangolo[1], thus only applies to the general toxic symptoms of the acute INH-intoxication, as is the case for vitamins B_2, B_{12}, A, E, K, and niacinamide.

PRO EXPERIMENTIS

Agar Diffusion Plates: The Recording of Experimental Data

The gel diffusion method of Ouchterlony[1] for the study of antigen-antibody reactions has found increasing application to immunological problems. Several descriptions of the technique have been given[2] but typically experiments are set up in Petri dishes and result in the formation of zones or fine lines of antigen-antibody precipitates in an agar gel matrix *approximately* 10 cm diameter and 3 mm deep. The line patterns observed are recorded usually by sketch or photograph but in some instances it is convenient if the whole contents of a Petri dish can be preserved. Gell[3] has demonstrated the partial desiccation of agar diffusion plates and the present communication describes an extension of this method.

Agar diffusion plates intended for preservation were cleaned by rinsing out the reagent reservoirs with water using a Pasteur pipette. Petri dishes containing the agar discs were then filled with water and the fluid changed about three times a day for three days. At the end of this time, when excess buffer and reagents had been leached from the agar, dishes and their washed contents were immersed in a large bowl of water, gently agitated, and the agar discs floated from their containers onto lantern-slide cover-glasses (3¼ × 3¼ in.). Cover-glasses and adhering discs were taken from the bowl, excess fluid removed with a Pasteur pipette and the preparations placed on a horizontal surface to dry at 18°. While drying, a large watch-glass was suspended over each disc; this allowed free access of air but prevented contamination by dust. After 3–4 days each disc dried to a tough, transparent film which adhered to its cover-glass and which differed little in diameter from an untreated disc but was *approximately* 0·5 mm in thickness. Insufficient washing resulted in opacity and the formation of salt crystals in dried preparations; hardening washed agar discs in 10% v/v formalin before transfer to cover-glasses was of no advantage in manipulation. Attempts to increase the rate of desiccation by drying either *in vacuo* or at 37° were not successful as in both cases marked distortion occurred and dried discs tended to peel off the supporting cover-glasses.

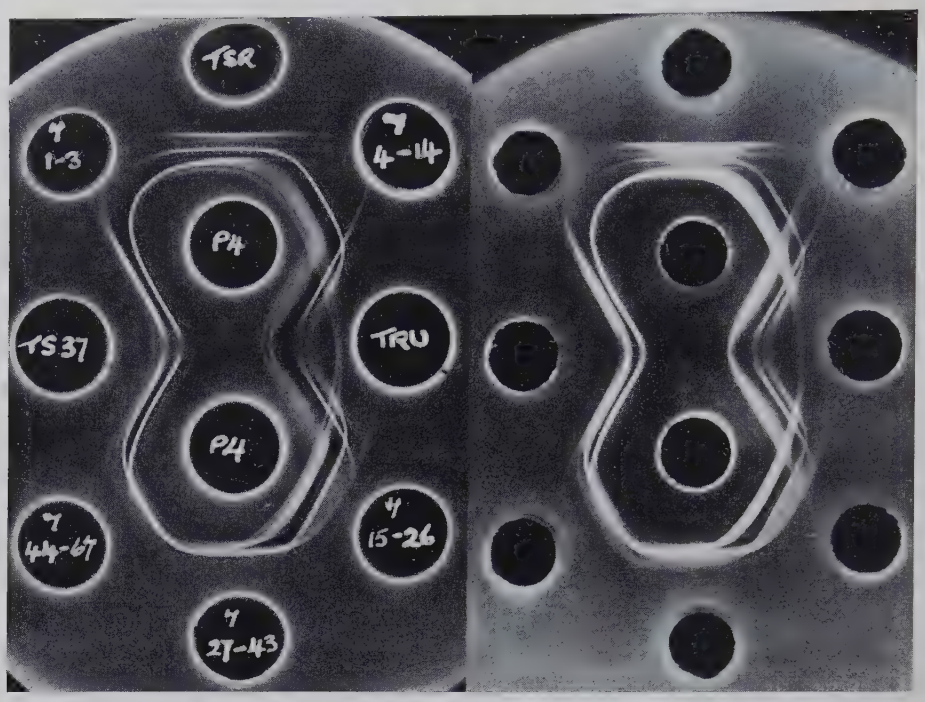
Dried preparations were best inspected against a dark background with the aid of a hand-lens. Opaque lines of precipitation were clearly seen in the transparent yellow matrix and the precipitation patterns obtained were identical with those recorded by sketch before drying (Figure). In some cases diffuse zones of precipitation were poorly preserved although the clarity of fine lines of precipitation was often enhanced, due possibly to a condensation of antigen-antibody complex on desiccation. Increased definition was obtained by staining the discs with dye before drying and such preparations could be projected as lantern-slides for demonstration purposes.

To effect staining, Petri dishes containing washed agar discs were filled with a 0·1% aqueous dye solution and allowed to stand at 18° until the dye had penetrated the discs. With protein stains this process required *approximately* 3 h at the end of which time excess dye was removed and the plates washed with water to differentiate the lines from the matrix. Since no fixative was used, differentiation was dependent upon the relative intensities of dye adsorption on the polysaccharide matrix and the protein contained in the antigen-antibody precipitates. Best results were obtained by staining the lines of precipitation with naphthol black or congo red

[1] Ö. Ouchterlony, Ark. Kemi. Min. Geol. *26 B*, 14, 16 (1948).

[2] B. Björklund, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *79*, 319 (1952). – D. A. Darcy, Nature *176*, 643 (1955). – M. Kaminski and Ö. Ouchterlony, Bull. Soc. Chim. Biol. *33*, 758 (1951). – C. R. Schiott, Acta Path. microbiol. Scand. *32*, 251 (1953). – M. W. Wilson and B. H. Pringle, J. Immunol. *73*, 232 (1954).

[3] P. G. H. Gell, Biochem. J. *59*, viii (1955).



a *b*

(*a*) Agar diffusion plate stained with naphthol black and dried. The dried preparation was labelled with black waterproof ink, dyes of other inks being soluble in the mounting media solvent. (*b*) Photograph of plate *a* taken before staining and drying.

which left the agar matrix uncoloured. A photograph of such a preparation is shown in the Figure where a photograph of the same experiment taken before preservation is given also. In one case an uncoloured precipitation pattern in a deeply stained matrix was obtained by treatment with 0·1% aqueous toluidine blue followed by washing with 1% acetic acid. Attempts to use selective staining methods[4] however were not successful; basic fuchsin, mucicarmine, osmic acid and the Schiff reagents failed to give reproducible, selective staining of any of the precipitation lines produced by *Pasteurella pestis* antigens and *P. pestis* antisera[5].

Stained and dried preparations could be subjected to some degree of handling without damage. They adsorbed little or no moisture on exposure to laboratory conditions and were resistant to abrasion. On prolonged storage however, dried agar discs tended to peel away from the supporting cover-glasses and some additional protection was found desirable. Semi-permanent preparations were obtained by coating dried agar discs with Bedacryl 122 X, a colourless solution of a polymethacrylic resin in xylene. The resin dried by solvent evaporation resulting in a highly polished slide, but the surface was not very resistant to scratching and was damaged by organic solvents. More durable results were obtained by mounting each dried disc in a manner analogous to microscopic preparations. An epoxy-resin hardened with 3-diethylaminopropylamine was used for this purpose since mounting media drying by solvent evaporation could not be used due to the large enclosed surface area involved. The resin was similar in composition to 'Araldite' Type 101 (Aero Research Ltd.) but of lower viscosity. In use, hardener (1 part) was pipetted into a tube containing resin (10 parts), the solutions mixed carefully and the mixture centrifuged at 3,000 r.p.m. for 5 min to remove air bubbles. By means of a pipette with an enlarged jet 1·2–1·5 ml of the mixture was put in the centre of a dried preparation and a clean lanternslide cover-glass lowered gently on top. After keeping overnight at 37° excess hardened resin was removed from the edge of the preparation with a scalpel and the slide faces cleaned with cellosolve or acetone. To prevent the small excess of resin hardening on the slide faces and to facilitate handling while mounting it was convenient to put strips of adhesive tape along the underside edges of the dried preparations leaving 1 cm of tape free. The tape was stripped off after hardening together with most of the excess resin.

The authors wish to thank I.C.I. Ltd. (Dyestuffs Division) for a supply of Bedacryl 122 X and Mr. J. Russel of C.D.E.E., Porton, for the preparation of a number of epoxy-resins.

C. J. M. Rondle[6] and B. Joan Carman

Microbiological Research Establishment, Ministry of Supply, Porton, England, July 30th, 1956.

Zusammenfassung

Ein Auswertungsverfahren der Antigen-Antikörper-Analyse mittels der Geléediffusionsmethode von Ouchterlony wird beschrieben.

Die Muster des Niederschlags im Versuch werden angefärbt und der Agar-Gelée-Nährboden mit dem Muster wird durch Austrocknung konserviert.

So gefärbte und getrocknete Präparate können, visuell geprüft, als Negative oder Diapositive verwendet werden.

[4] B. Björklund, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *85*, 438 (1954). – L. Korngold and R. Lipari, Science *121*, 170 (1955). – P. Grabar and J. A. Williams, Biochem. biophys. Acta *10*, 193 (1953).

[5] M. J. Crumpton and D. A. L. Davies, Proc. roy. Soc. [B] *145*, 109 (1956).

[6] Senior Research Fellow, Ministry of Supply.

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

EXPERIENTIA MAIORUM

Der qualitative und quantitative Nachweis der «fixen Luft» (1756), ein Wendepunkt in der Geschichte der Chemie und Biologie[1]

Josef Black (1728–1799), der 1756 den experimentellen Nachweis der «fixen Luft» als erster beschrieb. Nach einer Karikatur von John Kay[2].

Im zweiten Band der *Essays and Observations, Physical and Literary*, der im Jahre 1756 von einer gelehrten Gesellschaft in Edinburg herausgegeben wurde, erschien eine 68 Seiten umfassende Abhandlung *Experiments upon Magnesia alba, Quicklime and some other Alcaline Substances*, deren wichtigste Ergebnisse von ihrem bis dahin unbekannten Verfasser mündlich vorgetragen worden waren. Es war der junge schottisch-irische Arzt Joseph Black (1728–1799), ein Assistent des berühmten Professors William Cullen, der sich auf diese Weise in die Wissenschaften einführte. Von späteren kompetenten Fachleuten ist diese Abhandlung wegen ihrer mustergültigen Darstellung und der Bedeutung des darin Mitgeteilten unmittelbar neben Newtons *Optik* eingereiht worden. Es dürfte daher am Platz sein, in einer internationalen, dem Fortschritt der Naturwissenschaften gewidmeten Zeitschrift auf diese klassische Arbeit kurz aufmerksam zu machen. Insbesondere liegt uns daran, die Ausweitung dieser Studien in biologischer Richtung aufzuzeigen.

Über diese Zusammenhänge ist seit dem grossen Lavoisier kaum mehr in genügender Weise berichtet worden. In dessen *Opuscules physiques et chimiques* (1774), einem seiner Erstlingswerke, das vor allem der Erforschung der Verbrennungsvorgänge galt, kommt Black allerdings bereits schlecht weg, indem unbedeutendere Gefolgsleute, die auf seinen Forschungen weiterbauten, ausführlicher gewürdigt werden. Das Verdienst Lavoisiers in literarischer Hinsicht liegt darin, dass er – wie auch in seiner späteren Forschung – die Anwendung der neuen Erkenntnisse auf biologische Probleme in seine Darstellung einbezogen hat, was leider von späteren Historikern der Chemie nicht in gleicher Weise gesagt werden kann.

Unter den Wegbereitern auf Black hin verdienen zwei Landsleute, nämlich der Schüler Robert Boyle's, John Mayow (1645–1679), und Stephen Hales (1677–1761), einer der originellsten Forscher aller Zeiten und gleichzeitig Landpfarrer, besonders hervorgehoben zu werden. Während Mayow den atembaren Bestandteil der Luft intuitiv erkannte und in physiologischen Experimenten grundsätzlich richtig erfasste, blieben dem letzteren in heute ganz unverständlicher Weise vor lauter rechnerisch-quantitativen Überlegungen die verschiedenen Eigenarten der von ihm entwickelten Gase (H_2, CH_4, CO_2, O_2) völlig verborgen.

So war es dem zuerst in Glasgow und später in Edinburg tätigen Black vorbehalten, erstmals ein mit festen Körpern verbundenes Gas qualitativ und quantitativ exakt nachzuweisen. Ausgehend von der damals hochaktuellen Streitfrage, ob es Salzlösungen gebe, die Blasensteine aufzulösen imstande seien, untersuchte der junge Forscher während mehreren Jahren mit zielstrebiger Methode und zäher Ausdauer Magnesium- und Kalksalze. Es können hier nur ganz summarisch die wichtigsten Ergebnisse der streng logisch aufgebauten Untersuchung genannt werden:

1. Im Gegensatz zur damals gültigen Anschauung, nach der das Mildwerden des Kalkes aus dem Verlust eines Feuerstoffes bestehen sollte, stellte Black dabei eine Gewichtszunahme «durch Luftabsorption» fest.

2. Die Efferveszenz von Kreide mit Säuren, verglichen mit dem Kalzinieren des Kalkes, ergab, dass der Gewichtsverlust in beiden Fällen gleich gross sei. Aus dieser Gegenüberstellung resultierte als Ursache des Mildwerdens der Alkalien der Übergang von «Luft» an das Alkali.

3. Der flüchtige Teil der Salze (Kalk, Epsomer Salz) machte $^7/_{12}$ des Gewichtes aus. Durch Behandlung der milden Magnesia mit Säuren und durch Glühen ging gleichviel an Gewicht verloren. Damit waren die quantitativen Verhältnisse bereits weitgehend richtig erfasst. Der Rechnungsfehler Blacks betrug dabei nach William Ramsay (1909), seinem Biographen, nur 4%.

4. In einem weiteren Schritt gelangte Black am Kalk zu der Feststellung, dass die sich mit alkalischen Stoffen vereinigende «Luft» den Charakter einer Säure haben müsse.

5. Aus Absorptionsversuchen mit Kalkwasser im Boyleschen Vakuum und an der atmosphärischen Luft ging hervor, dass sich dieses «bloss mit einer besonderen Art» Luft vereinigt, «die in der Atmosphäre verteilt ist».

[1] Eine ausführlichere Würdigung dieses geschichtlichen Sachverhalts erscheint in Gesnerus (Schweiz) *1956*, Heft 3/4.

[2] Das Cliché wurde uns freundlicherweise von der Redaktion des CIBA-Symposium zur Verfügung gestellt.

Für dieses Gas behielt Black den bereits bekannten Namen der «fixen Luft» («fixed air») bei.

Black war sich der geschichtlichen Bedeutung des exakten Nachweises eines gasförmigen Stoffes durchaus bewusst, wie aus der rückblickenden Betrachtung in seinen *Vorlesungen über die Grundlehren der Chemie* hervorgeht. Diese «Lectures» wurden 1799 von seinem jüngeren Freund John Robison (1739–1805) aus dem Nachlass Blacks herausgegeben. Erst aus diesem posthumen Werk erhielt die inzwischen völlig veränderte wissenschaftliche Welt offizielle Kenntnis von physiologischen Versuchen, in denen Black 1757 gezeigt hatte, dass das von ihm entwickelte Gas «allen Tieren tödlich ist, welche es durch den Mund und die Nasenlöcher einatmen». Ja er erkannte sogar, dass die durch das Atmen eingetretene Veränderung der Luft darin besteht, «dass ein Teil derselben in fixe Luft» umgewandelt wird. Den Beweis für die Richtigkeit dieser Lehre erbrachte er kurz darauf in einem äusserst interessanten Massenexperiment: In eine Dachöffnung einer von 1500 Menschen besetzten Kirche in Glasgow brachte er Lappen, die mit einer Lösung von «kaustischem Mineralalkali» getränkt waren. Durch die ausgeatmete Luft der grossen Menschenmenge wurde nun diese Lösung, wie Robison berichtet, in mildes Alkali verwandelt. Auch die Entstehung der Kohlensäure bei der Gärung wurde geprüft.

Es scheint uns, dass diese ersten, bisher kaum allgemein bekannten späteren Untersuchungen im Hinblick auf die weitere Entwicklung von ausserordentlich grosser Bedeutung sind. Sie stellen nicht nur die Anfänge der sogenannten pneumatischen Chemie dar, sondern die *Anfänge chemischer Experimentalforschung in der Biologie*. Als *erste physiologische Wendung in der Chemie* bilden sie eine Vorstufe für das ähnlich gerichtete Lebenswerk des Franzosen Lavoisier, dessen früheste Versuche dem schottischen Arzt sicher Wesentliches verdanken. Unmittelbaren Einfluss gewannen Blacks Arbeiten auf den schottischen Chirurgen David Macbride (1726 bis 1778), der dessen Methodik verfeinerte und sie zum Nachweis der Kohlensäure im Blut (1764) heranzog, eine nur wenig bekannte Tatsache unter vielen, welche die auch in der wissenschaftlichen Medizin eingetretene Neuorientierung illustriert. Aus diesem Grunde und weil von Black bis zu Lavoisier die Kette genialer pneumatisch-physiologischer Experimente nicht mehr abreissen sollte, hat die Abhandlung des Jahres 1756 verdient, der Vergessenheit entrissen zu werden.

H. Buess

Medizinisch-Historisches Institut der Universität Basel, den 20. August 1956.

Summary

Reference is made to a treatise published in 1756 by Joseph Black (1728–1799), which was the first work to contain conclusive evidence of a gas bound to solid bodies; and in this connection the historical significance of the earliest studies on carbon dioxide is emphasised. Attention is drawn in particular to a subject about which little has hitherto been known, *i.e.*, the use which Black and his contemporaries (notably David Macbride) made of this discovery by applying it to animal and human physiology.

STUDIORUM PROGRESSUS

Synthesis of a Polypeptide with ACTH-like Structure

By R. A. Boissonnas, St. Guttmann, J.-P. Waller, and P.-A. Jaquenoud*

The structure of the main component of hog ACTH has recently been elucidated by Bell *et al.*[1] and by White and Landmann[2]. It is a linear polypeptide composed of thirty-nine amino acids residues: seryl-tyrosyl-seryl-methionyl-glutamyl-histidyl-phenylalanyl-arginyl-tryptophanyl-glycyl-lysyl-prolyl-valyl-glycyl-lysyl-lysyl-arginyl-arginyl-prolyl-valyl-lysyl-valyl-tyrosyl-prolyl-aspartyl-glycyl-alanyl-glutamyl-aspartyl-glutaminyl (or glutamyl)-leucyl-alanyl-glutamyl-alanyl-phenylalanyl-prolyl-leucyl-glutamyl-phenylalanine. Hofmann and Jöhl[3] have confirmed by synthesis the sequence of the first five N-terminal amino acids of this structure.

Li *et al.*[4] have found that sheep ACTH is structurally closely related to hog ACTH, the only differences being located in the carboxyl moiety of the molecule.

Large fragments can be enzymatically or chemically split from the carboxyl end of the ACTH molecules without loss of the biological activity. On the other hand splitting of peptides bonds at the amino end of the molecule is followed by complete inactivation. The biologically active part of the molecule is therefore located in the amino moiety, which presents the same sequence of amino acids for the diverse ACTH molecules hitherto investigated.

We have recently reproduced the sequence of the first twenty N-terminal amino acids of this common moiety of the ACTH molecules by achieving the synthesis of an icosapeptide: seryl-tyrosyl-seryl-methionyl-glutamyl-histidyl-phenylalanyl-arginyl-tryptophanyl-glycyl-lysyl-prolyl-valyl-glycyl-lysyl-lysyl-arginyl-arginyl-prolyl-valine methyl ester. This icosapeptide ester is by four amino acids residues shorter than the smallest biologically active fragment hitherto obtained by degradation of an ACTH molecule. Assayed by the method of Saffran and Schally[5], our synthetic product exhibited a positive, though limited, ACTH activity (2–3 UI/mg). The possibility of a certain amount of racemization at some steps of the synthesis cannot be excluded. We give below a preliminary report on this synthesis.

CBO-arginine[6] was condensed by dicyclohexylcarbodiimide (DCCI)[7] with arginine methyl ester dibromhydrate (V) in dimethylformamide (DMF) to CBO

* Laboratory of Organic and Pharmaceutical Chemistry, University of Geneva and Department of Pharmaceutical Chemistry, Sandoz Ltd., Basle. July 21, 1956.

[1] P. H. Bell *et al.*, J. Amer. chem. Soc. *76*, 5565 (1954); *77*, 3419 (1955).

[2] W. F. White and W. A. Landmann, J. Amer. chem. Soc. *76*, 4193 (1954); *77*, 771, 1711 (1955).

[3] K. Hofmann and A. Jöhl, J. Amer. chem. Soc. *77*, 2914 (1955).

[4] C. H. Li *et al.*, Nature *176*, 687 (1955).

[5] M. Saffran and A. V. Schally, Endocrinology *56*, 523 (1955).

[6] All starting amino acids were of the L-form.

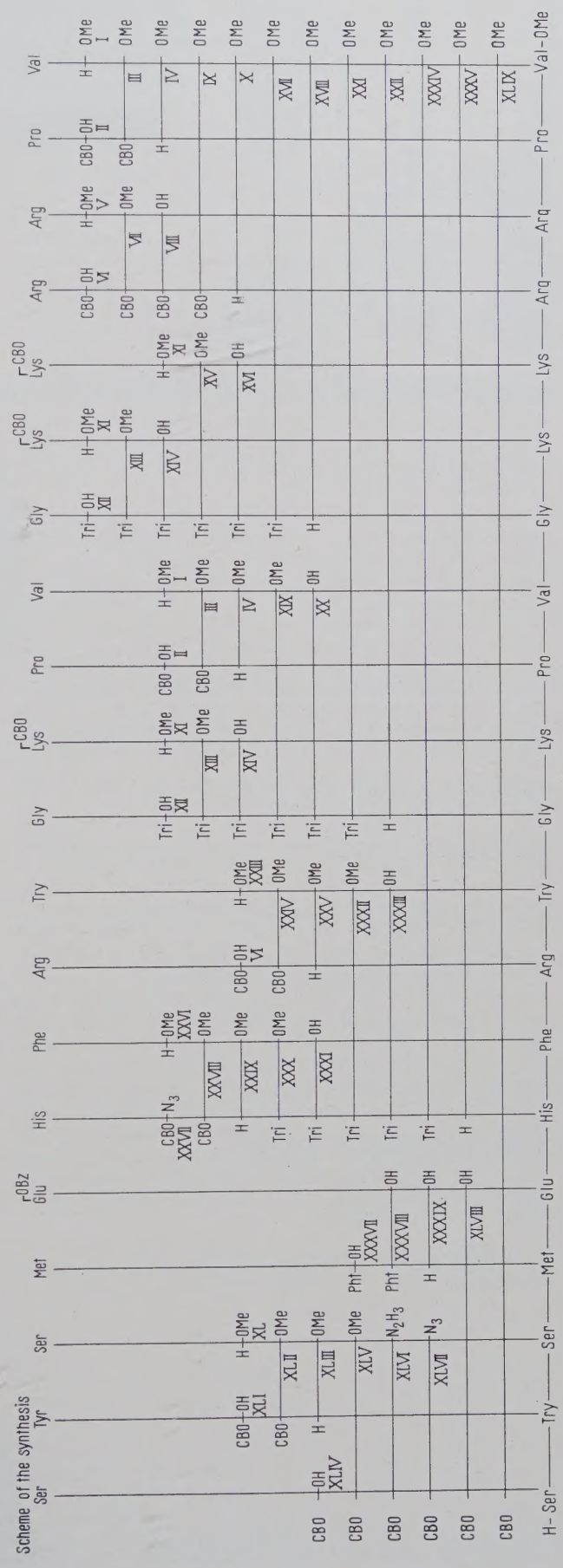
[7] J. C. Sheehan and G. P. Hess, J. Amer. chem. Soc. *77*, 1067 (1955).

arginyl-arginine methyl ester dibromhydrate (VII; 58% yield. Rf^*_M 0·30[8]. Analysis calculated for $C_{21}H_{36}O_5N_8Br_2$: N 17·50; Br 24·96. Found: N 17·00; Br 25·40). This was saponified to CBO-arginyl-arginine dibromhydrate (VIII; 98% yield. Rf^*_M 0·09. Analysis calculated for $C_{20}H_{34}O_5N_8Br_2$: N 17·89. Found: N 16·75) and condensed by DCCI and tributylamine (TBA) in DMF with prolyl-valine methyl ester bromhydrate (IV), obtained by HBr/acetic acid scission of CBO-prolyl-valine methyl ester[9] (III), to CBO-arginyl-arginyl-prolyl-valine methyl ester dibromhydrate (IX; 57% yield. Analysis calculated for $C_{31}H_{52}O_7N_{10}Br_2$: N 16·74; Br 19·10. Found: N 16·81; Br 19·98), which was cleaved by HBr/acetic acid into arginyl-arginyl-prolyl-valine methyl ester tribromhydrate (X; 74% yield. Rf_M 0·47. Rf_A 0·52. Analysis calculated for $C_{23}H_{47}O_5N_{10}Br_3$: Br 30·63. Found: Br 30·25).

Di-CBO-lysine[10] was converted by thionylchloride and methanol to ε-CBO-lysine methyl ester chlorhydrate[10] (XI; 72% yield), which was condensed with trityl-glycine[11] by the mixed anhydride method in tetrahydrofurane (THF) to trityl-glycyl-ε-CBO-lysine methyl ester (XIII; 85% yield. M.p. dec. 75°. Rf^*_M 0·79. Analysis calculated for $C_{36}H_{39}O_5N_3$: N 7·08. Found: N 6·91), which was saponified to trityl-glycyl-ε-CBO-lysine (XIV; 85% yield. M.p. 110°. Rf^*_M 0·41. Analysis calculated for $C_{35}H_{37}O_5N_3$: N 7·25. Found: 7·05). This was condensed by DCCI in THF with ε-CBO-lysine methyl ester to trityl-glycyl-ε-CBO-lysyl-ε-CBO-lysine methyl ester (XV. Rf^*_A 0·85. Analysis calculated for $C_{50}H_{57}O_8N_5$; N 8·18. Found N 8·03), which was saponified to trityl-glycyl-ε-CBO-lysyl-ε-CBO-lysine (XVI; 79% overall yield. M.p. 80°. Rf^*_A 0·60. Analysis calculated for $C_{49}H_{55}O_8N_5$; C 69·89; H 6·58; N 8·32; equivalent weight 842. Found: C 69·67; H 6·98; N 8·25; equivalent weight 840).

The latter tripeptide was condensed by DCCI in DMF with the tetrapeptide X to trityl-glycyl-ε-CBO-lysyl-ε-CBO-lysyl-arginyl-arginyl-prolyl-valine methyl ester dibromhydrate (XVII; 45% yield. M.p. dec. 150°. Rf^*_M 0·64. Analysis calculated for $C_{72}H_{99}O_{12}N_{15}Br_2$: N 13·77; Br 10·47. Found: N 13·77; Br 10·31), which was cleaved by hot acetic acid to glycyl-ε-CBO-lysyl-ε-CBO-lysyl-arginyl-arginyl-prolyl-valine methyl ester monoacetate dibromydrate (98% yield. M.p.dec. 133°. Rf_M 0·65. Analysis calculated for $C_{55}H_{89}O_{14}N_{15}Br_2$: N 15·61. Found: N 15·61) and treated with HBr to obtain the tribromhydrate (XVIII; 92% yield. Analysis calculated for $C_{53}H_{86}O_{12}N_{15}Br_3$: N 15·39; Br 17·55; $-OCH_3$ 2·27. Found: N 14·95; Br 17·31; $-OCH_3$ 2·22).

The above trityl-glycyl-ε-CBO-lysine (XIV) was condensed by DCCI in THF with prolyl-valine methyl ester bromhydrate (IV) to trityl-glycyl-ε-CBO-lysyl-prolyl-valine methyl ester (XIX; 93% yield. M.p.dec. 65°. Rf^*_A 0·75. Analysis calculated for $C_{46}H_{55}O_7N_5$: N 8·87. Found: N 8·50), which was saponified to trityl-glycyl-ε-CBO-lysyl-prolyl-valine (XX; 80% yield. M.p. 100°. Rf^*_A 0·65. Analysis calculated for $C_{45}H_{53}O_7N_5$: C 69·65; H 6·89; O 14·43; N 9·03; equivalent weight 776. Found: C 70·62; H 6·91; O 13·91; N 8·74; equivalent weight 769). The latter was condensed with the heptapeptide XVIII


Scheme of the synthesis
Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Try Gly Lys Pro Val Gly Lys Arg Arg Pro Val
CBO CBO CBO CBO CBO CBO
H-Ser—Try—Ser—Met—Glu—His—Phe—Arg—Try—Gly—Lys—Pro—Val—Gly—Lys—Arg—Arg—Pro—Val—Val-OMe

[8] Ascending chromatograms on S. & S. 2040 *b* ausgew.; Rf_A in isoamyl alcohol:pyridine:water 35:35:30; Rf_M in methylethylketone:pyridine:water 65:15:20; * indicates a preliminary scission of the α-amino protecting group.

[9] R. L. M. Synge, Biochem. J. *42*, 99 (1948).

[10] M. Bergmann, L. Zervas, and W. F. Ross, J. biol. Chem. *111*, 245 (1935).

[11] G. Amiard, R. Heymès, and L. Velluz, Bull. Soc. chim. France *1955*, 191.

by DCCI and TBA in DMF to trityl-glycyl-ε-CBO-lysyl-prolyl-valyl-glycyl-ε-CBO-lysyl-ε-CBO-lysyl-arginyl-arginyl-prolyl-valine methyl ester dibromhydrate (XXI; 49% yield. M.p. dec. 150°. Rf_A^* 0·62. Analysis calculated for $C_{98}H_{136}O_{18}N_{20}Br_2$: N 13·71. Found: N 13·72). Successive treatments by hot acetic acid, IRA-410 and three equivalents of HCl gave glycyl-ε-CBO-lysyl-prolyl-valyl-glycyl-ε-CBO-lysyl-ε-CBO-lysyl-arginyl-arginyl-prolyl-valine methyl ester trichlorhydrate (XXII; 82% yield. M.p. dec. 175°. Rf_A 0·68. Analysis calculated for $C_{79}H_{123}O_{18}N_{20}Cl_3$: C 54·30; H 7·10; O 16·48; N 16·03; Cl 6·09. Found: C 54·25; H 7·03; O 17·13; N 15·47; Cl 6·18).

CBO-arginine and tryptophane methyl ester chlorhydrate were condensed by DCCI in DMF to CBO-arginyl-tryptophane methyl ester chlorhydrate (XXIV; 84% yield. Rf_M^* 0·55. Analysis calculated for $C_{26}H_{33}O_5N_6Cl$: N 15·42; Cl 6·51. Found: N 15·20; Cl 6·47), which was converted by HBr/acetic acid (free of bromine and of aldehyde) to arginyl-tryptophane methyl ester dibromhydrate (XXV; 91% yield. M.p. dec. 240°. Rf_M 0·55. Analysis calculated for $C_{18}H_{28}O_3N_6Br_2$: N 15·67; Br 29·80. Found: N 15·64; Br 29·60).

CBO-histidyl-azide[12] (XXVII) was reacted with phenylalanine methyl ester (XXVI) to CBO-histidyl-phenylalanine methyl ester (XXVIII; 82% yield. M.p. 108°. Rf_M^* 0·75. Analysis calculated for $C_{24}H_{26}O_5N_4$: N 12·44. Found: N 12·60), which was cleaved by HBr/acetic acid to the dibromhydrate (XXIX; 98% yield. M.p. 140°. Rf_M 0·75. Analysis calculated for $C_{16}H_{22}O_3N_4Br_2$: Br 33·42. Found: Br 34·0) and tritylated to ditrityl-histidyl-phenylalanine methyl ester (XXX; 91% yield. M.p. 70°. Analysis calculated for $C_{54}H_{48}O_3N_4$: N 6·99. Found: N 6·93). This was saponified to ditrityl-histidyl-phenylalanine (XXXI; 90% yield. M.p. 120°. Rf_M^* 0·37. Analysis calculated for $C_{53}H_{46}O_3N_4$: N 7·12. Found: N 7·11), which was condensed with the dipeptide XXV by DCCI and TBA in DMF to ditrityl-histidyl-phenylalanyl-arginyl-tryptophane methyl ester bromhydrate (XXXII; 89% yield. M.p. 185°. Rf_M^* 0·67. Analysis calculated for $C_{71}H_{71}O_5N_{10}Br$: N 11·44. Found: N 11·56). This was saponified to ditrityl-histidyl-phenylalanyl-arginyl-tryptophane (XXXIII; 88% yield. M.p. 228°. Rf_M^* 0·48. Analysis calculated for $C_{70}H_{68}O_5N_{10}$: N 12·40. Found: 12·13). The latter was condensed with the endecapeptide XXII by DCCI in DMF to ditrityl-histidyl-phenylalanyl-arginyl-tryptophanyl-glycyl-ε-CBO-lysyl-prolyl-valyl-glycyl-ε-CBO-lysyl-ε-CBO-lysyl-arginyl-arginyl-prolyl-valine methyl ester trichlorhydrate (XXXIV; 73% yield. M.p. 200°. Rf_M^* 0·65. Analysis calculated for $C_{149}H_{189}O_{22}N_{30}Cl_3$: C 62·59; H 6·66; Cl 3·72. Found: C 61·25; H 6·48; Cl 2·96). Treatment with hot acetic acid followed by HCl gave histidyl-phenylalanyl-arginyl-tryptophanyl-glycyl-ε-CBO-lysyl-prolyl-valyl-glycyl-ε-CBO-lysyl-ε-CBO-lysyl-arginyl-arginyl-prolyl-valine methyl ester pentachlorhydrate (XXXV; 89% yield. M.p. dec. 220°. Rf_A^* 0·65. Analysis calculated for $C_{111}H_{163}O_{22}N_{30}Cl_5$: C 54·45; H 6·72; O 14·38; N 17·17. Found: C 52·88; H 6·80; O 13·92; N 17·44).

Phtalyl-methionine was condensed by DCCI with the triethylammonium salt of γ-benzyl-glutamic acid to phtalyl-methionyl-γ-benzyl-glutamic acid (XXXVIII), which was cleaved by one equivalent of hydrazine into methionyl-γ-benzyl-glutamic acid monohydrate which was purified by partition chromatography (XXXIX; 26% over all yield. Rf_M 0·63. Analysis calculated for $C_{17}H_{26}O_6N_2S$: N 7·26. Found: N 7·31).

CBO-tyrosine was condensed with serine methyl ester by DCCI in chloroform to CBO-tyrosyl-serine methyl ester (XLII; 70% yield. M.p. 151°. Rf_M^* 0·90. Analysis calculated for $C_{21}H_{24}O_7N_2$: N 6·73. Found: N 6·69), which was cleaved by HBr/acetic acid to tyrosyl-serine methyl ester bromhydrate (XLIII; 98% yield). This was condensed with CBO-serine by DCCI and TBA in DMF to CBO-seryl-tyrosyl-serine methyl ester (XLV; 75% yield. M.p. 165°. Rf_M^* 0·95. Analysis calculated for $C_{24}H_{29}O_9N_3$: N 8·34. Found: N 8·32), which was converted into the hydrazide (XLVI; 68% yield. M.p. 230°. Analysis calculated for $C_{23}H_{29}O_8N_5$: C 54·86; H 5·81; O 25·42; N 13·91. Found: C 55·36; H 6·63; O 24·22; N 14·48). The corresponding azide was reacted in DMF with the triethylammonium salt of the dipeptide XXXIX to CBO-seryl-tyrosyl-seryl-methionyl-γ-benzyl-glutamic acid (XLVIII; 65% yield. M.p. dec. 150°. After scission by HBr in a mixture of acetic acid and methyl-ethyl-thioether[13]: Rf_M 0·60[14]. Analysis calculated for $C_{40}H_{49}O_{13}N_5S$: N 8·34; equivalent weight 840. Found: N 8·33; equivalent weight 816). This was condensed with the pentadecapeptide XXXV by DCCI and TBA in DMF to CBO-seryl-tyrosyl-seryl-methionyl-γ-benzyl-glutamyl-histidyl-phenylalanyl-arginyl-tryptophanyl-glycyl-ε-CBO-lysyl-prolyl-valyl-glycyl-ε-CBO-lysyl-ε-CBO-lysyl-arginyl-arginyl-prolyl-valine methyl ester trichlorhydrate (XLIX; 77% yield. M.p. dec. 200°. Analysis calculated for $C_{151}H_{208}O_{34}N_{35}SCl_3$: N 15·34. Found: N 15·72. The hydrolysate presents a correct chromatographic correlation with a synthetic mixture of amino acids). The protecting groups of this icosapeptide were cleaved by HBr in a mixture of acetic acid and methyl-ethyl-thioether[13]. After evaporation in vacuo the residue was dissolved in water. The icosapeptide precipitates from its aqueous solution at pH above 6.

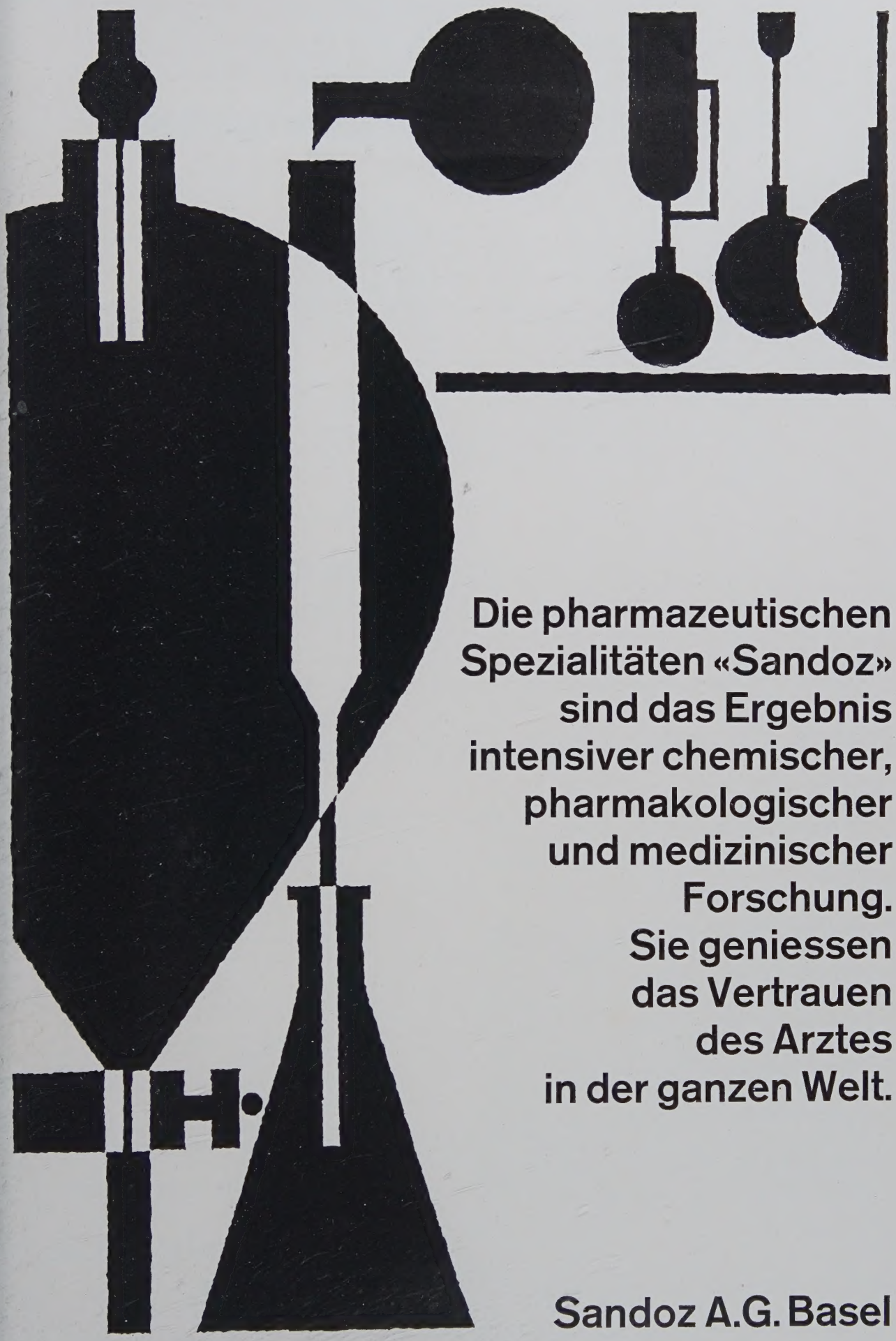
Zusammenfassung

Es wird über die Synthese eines Icosapeptides, das aus den zwanzig ersten Aminosäuren des N-Endes eines ACTH Moleküls aufgebaut ist, berichtet. Das synthetische Produkt besitzt eine schwache ACTH-Wirkung.

[12] R. W. Holley and E. Sondheimer, J. Amer. chem. Soc. *76*, 1326 (1954).

[13] To fix the benzyl bromide produced.

[14] In sec-butanol: 3% ammonia it appears between glutamic acid and lysine. *Cf.* footnote 3.



Die pharmazeutischen
Spezialitäten «Sandoz»
sind das Ergebnis
intensiver chemischer,
pharmakologischer
und medizinischer
Forschung.
Sie geniessen
das Vertrauen
des Arztes
in der ganzen Welt.

Sandoz A.G. Basel

NEUERSCHEINUNG

Erwachende Wissenschaft

Ägyptische, babylonische
und griechische Mathematik

Von Dr. B. L. VAN DER WAERDEN, Professor an der Universität Zürich. Aus dem Holländischen übersetzt von HELGA HABICHT und mit Zusätzen vom Autor versehen. 488 Seiten mit 180 Figuren. In Ganzleinen gebunden Fr./DM 37.50. Sammlung «Wissenschaft und Kultur», Band 8.

Aus dem Inhalt: Einführung: *Wozu Geschichte der Mathematik* – I. *Die Ägypter* – II. *Zahlensysteme, Ziffern und Rechenkunst* – III. *Babylonische Mathematik* – IV. *Das Jahrhundert von Thales und Pythagoras* – V. *Das goldene Zeitalter* – VI. *Die Zeit Platons* – VII. *Die Alexandrinische Zeit* – VIII. *Niedergang der griechischen Mathematik* – Sachverzeichnis.

Der Autor war bestrebt, das Buch einerseits wissenschaftlich exakt, andererseits aber auch leichtfasslich zu machen in dem Sinne, dass jeder, der an einer Mittelschule Mathematik gelernt hat und sich für die Geschichte der Mathematik interessiert, es verstehen kann. – Die Geschichte der Mathematik erscheint im rechten Licht nur, wenn man sie gegen den Hintergrund der allgemeinen Kulturgeschichte betrachtet. Das Leben in den griechischen Städten in der klassischen Zeit ist anders als das Leben an den Fürstenhöfen von Alexandrien und Syrakus, und die Wissenschaft wird vom Leben manchmal entscheidend beeinflusst.

Bestellungen an Ihren Buchhändler

Birkhäuser Verlag
Basel / Stuttgart

Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta

Herausgegeben vom Schweiz. Verein für Physiologie, physiologische Chemie und Pharmokologie.

Redaktion: K. Bucher, Basel; F. Leuthardt, Zürich; O. Wyss, Zürich.

Fasc. 3 (1956) enthält folgende Arbeiten:

R. J. H. Oberholzer und F. A. Steiner: Die Erregbarkeit afferenter Fasern im Lungenvagus des Meerschweinchens – *H. Konzett und A. Carpi:* Weitere Untersuchungen zur ganglionären Wirkung von herzwirksamen Glykosiden – *H. Kilb und R. Stämpfli:* Eine Vorrichtung zur Membranpotentialmessung am einzelnen bespülten Ranvierschen Schnürring in Ruhe und Erregung – *F. Morel et M. Guinnebault:* Origine tubulaire du potassium excrété par le rein: Etude expérimentale à l'aide du radio-potassium K42 chez le lapin – *K. Zehnder und A. Cerletti:* Hemmung der Menschenserum-Pseudocholinesterase durch Lysergsäurediäthylamid und 2-Brom-Lysergsäurediäthylamid – *R. Jacques, H. J. Bein and R. Meier:* 5-Hydroxytryptamine Antagonists, with Special Reference to the Importance of Sympathomimetic Amines and Isopropyl-Noradrenaline – *R. Meier und W. Schuler:* Vergleich der Wirkung von Steroiden auf den Hefestoffwechsel – *R. Keller und W. Burkard:* Die Bedeutung der Gewebemastzellen für die Histaminfreisetzung – *M. Buensod et P. Favarger:* Observations sur la digestibilité des acides palmitique et stéarique et de leurs esters glycériques chez le rat – *J. Raaflaub:* Die Metallpufferfunktion der Adenosinphosphate – *K. Bucher und P. Bättig:* Zum Mechanismus der pulssynchronen Atmung – *B. Berde und A. Cerletti:* Über den Melanophoreneffekt von D-Lysergsäurediäthylamid und verwandten Verbindungen – *Th. Rosenberg, B. Vestergaard-Bogind und W. Wilbrandt:* Modellversuche zur Tägerhypothese von Zuckertransporten – *Karl Bernhard, G. Ulbrecht, M. Ulbrecht und H. Wagner:* Alimentär bedingte Leberverfettung und extrahepatogene Fettbildung – *H. Wirz:* Der osmotische Druck in den corticalen Tubuli der Rattenniere – *A. Fleisch:* Le Pneumotachographe – *E. Flückiger:* Der Sauerstoffverbrauch der Ratte bei vermindertem Sauerstoffpartialdruck – *Ed. Frommel:* Le diiodure de β-(N-diéthyl-méthylamino)-éthoxyéthyl-N'-(méthylpyrrolidine) (Sy 108).

Preis des Jahresabonnements: Fr. 40.–, zuzüglich Porto. Vorzugspreis für wissenschaftliche Institute: Fr. 33.50, zuzüglich Porto.

Abonnementsbestellungen an die Buchhandlungen oder direkt an

Benno Schwabe & Co.
Verlag · Basel